WELTORGANISATION FUR GEISTIGES EIGENTUM

LU, MC, NL, PT, SE).

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C12N 15/82, 9/10, C07K 16/40, C12N 1/00, A01H 5/00

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 99/29879

A1

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

17. Juni 1999 (17.06.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP98/08001

(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Dezember 1998 (09.12.98)

(30) Prioritätsdaten:

197 54 622.6

9. Dezember 1997 (09.12.97)

DE

VON SCHAEWEN, Antje (71)(72) Anmelder und Erfinder: [DE/DE]; Natruper Strasse 169a, D-49076 Osnabruck (DE).

(74) Anwalt: WIBBELMANN, Jobst; Wuesthoff & Wuesthoff, Schweigerstrasse 2, D-81541 München (DE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,

(54) Title: VEGETABLE Gntl SEQUENCES AND THE USE THEREOF TO OBTAIN PLANTS WITH A REDUCED OR LACK OF N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE I (GnTI) ACTIVITY

(54) Bezeichnung: PFLANZLICHE Gntl-SEQUENZEN UND VERWENDUNG DERSELBEN ZUR GEWINNUNG VON PFLANZEN MIT VERMINDERTER ODER FEHLENDER N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE I (GnTI)-AKTIVITÄT

(57) Abstract

The invention relates to vegetable Gntl sequences, especially vegetable nucleic acid sequences coding the enzyme N-acetylglucosaminyltransferase I (GnTI), DNA sequences derived therefrom including GntI antisense and sense constructs, and the products thereof, antibodies directed against these translation products and to the use of sequence information to obtain transformed micro-organisms and transgenic plants including those with reduced or a lack of N-acetylglucosaminyl -transferase 1 activity. Such plants with a reduced or lack of N-acetylglucosaminyl -transferase 1 activity are highly important for the production of glycoproteins having a specific constitution in relation to sugar residues.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft pflanzliche Gntl-Sequenzen, insbesondere pflanzliche Nukleinsäuresequenzen, die das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI) kodieren, davon abgeleitete DNA-Sequenzen einschließlich GntI-"antisense"- und "sense"-Konstrukten, und deren Translationsprodukte, gegen diese Translationsprodukte gerichtete Antikörper sowie die Verwendung der Sequenzinformation zur Gewinnung von transformierten Mikroorganismen und von trangenen Pflanzen, einschließlich solchen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität. Derartige Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität sind zur Herstellung von Glykoproteinen spezifischer Konstitution bezüglich der Zuckerreste von großer Bedeutung.

Pflanzliche GntI-Sequenzen und Verwendung derselben zur Gewinnung von Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI)-Aktivität

Die Erfindung betrifft pflanzliche GntI-Sequenzen, insbesondere pflanzliche Nukleinsäuresequenzen, die das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI) kodieren, wie auch davon abgeleitete GntI-"antisense" bzw. "sense"-Konstrukte, und deren Translationsprodukte, gegen diese Translationsprodukte gerichtete Antikörper sowie die Verwendung der Sequenzinformation zur Gewinnung von transformierten Mikroorganismen und von transgenen Pflanzen, einschließlich solchen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität. Derartige Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität sind zur Herstellung von Glykoproteinen spezifischer Konstitution bezüglich der Zuckerreste von großer Bedeutung.

Stand der Technik:

In Eukaryonten werden Glykoproteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) cotranslational (d.h. bei Import in das ER-Lumen)
durch Verknüpfung von zunächst membrangebundenen Glykanen (an
Dolicholpyrophosphat) mit spezifischen Asparagin-Resten in der
wachsenden Polypeptidkette zusammengesetzt (N-Glykosylierung).
In höheren Organismen unterliegen Zuckereinheiten, die an der
Oberfläche der gefalteten Polypeptidkette liegen, in den GolgiZisternen weiteren Trimm- und Modifikationsreaktionen (Ref. 1).
Durch verschiedene Glykosidasen und Glykosyltransferasen im ER
werden zunächst typische Glc₃Man₉GlcNAc₂-Grundeinheiten des
"high"-Mannose-Typs gebildet und anschließend bei Passage durch
die verschiedenen Golgi-Zisternen in sogenannte "komplexe" Glykane umgewandelt. Letztere zeichnen sich durch weniger Mannose-

Einheiten und den Besitz weiterer Zuckerreste, wie Fucose, Galaktose und/oder Xylose in Pflanzen bzw. Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure, NeuNAc) in Säugern, aus (Ref. 1,2,3). Das Ausmaß der Modifikationen ist von Glykoprotein zu Glykoprotein verschieden. Einzelne Polypeptidketten können heterogene Zuckerketten tragen. Zudem kann das Glykosylierungsmuster für ein bestimmtes Polypeptid variieren (gewebespezifische Unterschiede), und muß auch nicht immer bezüglich einer bestimmten Glykosylierungsstelle gleich sein, was als "Mikroheterogenität" bezeichnet wird (Ref. 4,5). Die Rolle von Asparagin-ständigen Glykanen ist bislang kaum verstanden, was u.a. daraus resultiert, daß diese mehrere Funktionen erfüllen können (Ref. 6). Jedoch ist anzunehmen, daß beispielsweise der Schutz einer Polypeptidkette vor proteolytischem Abbau auch durch Glykane eines einfacheren Oligomannosyl-Typs gewährleistet werden kann (Ref. 7).

Problemstellung:

Glykoproteine sind für Medizin und Forschung von großer Bedeutung. Eine Isolierung von Glykoproteinen im Großmaßstab ist jedoch aufwendig und teuer. Die direkte Anwendung konventionell isolierter Glykoproteine ist oft problematisch, da einzelne Reste der Glykan-Komponenten bei Verabreichung als Therapeutikum ungewünschte Nebenwirkungen auslösen können. Dabei trägt die Glykan-Komponente vor allem zu den physikochemischen Eigenschaften (wie Faltung, Stabilität und Löslichkeit) der Glykoproteine bei. Des weiteren tragen isolierte Glykoproteine, wie bereits ausgeführt, selten einheitliche Zuckerreste, was als "Mikroheterogenität" bezeichnet wird.

Hefen erweisen sich zur Gewinnung von Glykoproteinen für Medizin und Forschung als ungeeignet, da sie nur Glykosylierungen zum sogenannten "high"-Mannose-Typ durchführen können. Insekten und höhere Pflanzen zeigen zwar "komplexe", aber von Tieren abweichende Glykoproteinmodifikationen. Aus Pflanzen isolierte Glykoproteine wirken deshalb in Säugern stark antigen. Tieri-

sche Organismen mit Glykosylierungsdefekten sind meist nicht lebensfähig, da die terminalen Glykan-Reste (beispielsweise membranständiger Glykoproteine) meist biologische Signalfunktion besitzen und vor allem für die Zell-Zellerkennung während der Embryonalentwicklung unentbehrlich sind. Es existieren zwar bereits Säugerzellinien mit definierten Glykosylierungsdefekten, jedoch ist deren Kultivierung arbeitsintensiv und teuer.

Im Einzelnen wurden für Säuger auf Zellkulturebene bereits unterschiedliche Glykosylierungsmutanten beschrieben (Ref. 7,8, 9,10). Diese Mutanten sind entweder in der Biosynthese reifer Oligosaccharidketten am Dolicholpyrophosphat oder in der Glykan-Prozessierung betroffen bzw. zeigen Abweichungen in ihren terminalen Zuckerresten. Einige dieser Zellinien weisen einen konditional-lethalen Phänotyp auf oder zeigen Defekte im intrazellulären Proteintransport. Die Folgen dieser Defekte für den intakten Organismus sind schwer abschätzbar. Es wurde beobachtet, daß eine Veränderung im Muster komplexer Glykane auf Zelloberflächen von Säugern mit Tumor- und Metastasenbildung einhergeht, obwohl eine funktionale Beziehung noch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (Ref. 9). Glykosylierungsmutanten kommen in Säugern daher sehr selten vor. Diese unter HEMPAS (Hereditary Erythroblastic Multinuclearity with a Positive Acidified Serum lysis test) zusammengefaßten Defekte (Ref. 10,11) beruhen entweder auf einem Defizit von Mannosidase II und/oder niedrigen Gehalten des Enzyms N-Acetylglucosaminyltransferase II (GnTII) und wirken sich stark einschränkend auf die Lebensfähigkeit des mutierten Organismus aus. GntI-"knock out"-Mäuse, in denen das Gen für GnTI zerstört wurde, sterben bereits "in utero" an multiplen Entwicklungsdefekten (mündliche Mitteilung, H. Schachter, Toronto).

Für Pflanzen waren bis vor kurzem keine vergleichbaren Mutanten bekannt. Durch den Einsatz eines Antiserums, das spezifisch "komplex"-modifizierte Glykanketten pflanzlicher Glykoproteine erkennt und hauptsächlich gegen die hoch-antigenen $\beta 1 \rightarrow 2$ verknüpften Xylose-Reste gerichtet ist (Ref. 12), konnte die An-

melderin aus einer EMS-mutagenisierten F2-Population der genetischen Modellpflanze Arabidopsis thaliana mehrere unabhängige Mutanten isolieren, die keine "komplexe" Glykoproteinmodifikation mehr zeigten (complex glycan, cgl-Mutanten). Nach mindestens fünf Rückkreuzungen, jeweils gefolgt von intermittierenden Selbstungen (zum Wiederauffinden des rezessiven Defekts), wurden die Glykoproteine analysiert. Diese trugen hauptsächlich Glykane des Man₅GlcNAc₂-Typs, was auf einen Defekt in N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI) hindeutete (Ref. 8). Tatsächlich fehlte den Arabidopsis cgl-Mutanten GnTI-Aktivität (Ref. 13), welche normalerweise die erste Reaktion im Syntheseweg zu "komplex" modifizierten Zuckerketten katalysiert (Ref. 1). Nach bisherigen Beobachtungen resultiert daraus allerdings keine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der mutierten Pflanzen. In neueren Publikationen werden Pflanzen als mögliche Quelle zur Herstellung von pharmazeutisch relevanten Glykoproteinen oder Vakzinen vorgeschlagen (Ref. 14,15). Darin wird jedoch übersehen, daß aus Pflanzen isolierte Glykoproteine in Säugern starke Immunreaktionen auslösen können, was bisher einer Produktion heterologer Glykoproteine in Kulturpflanzen im Wege stand.

Pflanzen kommen weitgehend ohne "komplex" modifizierte Glykoproteine aus, wie die Anmelderin am Beispiel der Arabidopsis cgl-Mutante zeigen konnte (Ref. 13). In der Mutante werden sekretorische Proteine im ER zunächst normal glykosyliert. Im Golgi-Apparat der cgl-Mutante bleiben die über Asparagin-Reste (N-Glykosylierung) an das Polypeptidrückgrat gebundenen Oligomannosylketten dann jedoch auf Stufe von $\mathrm{Man}_5\mathrm{GlcNAc}_2$ -Resten stehen, da N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI)-Aktivität fehlt (Fig. 1). Durch diesen Biosyntheseblock wird die pflanzenspezifische "komplexe" Glykoproteinmodifikation und insbesonders die Anheftung von $\alpha 1 \rightarrow 3$ Fukose- und $\beta 1 \rightarrow 2$ Xylose-Resten verhindert, wodurch die stark antigene Wirkung auf den Säugerorganismus entfällt. Als krautige Pflanze besitzt Arabidopsis jedoch wenig verwertbare Biomasse. Zur Herstellung von biotech-

nologisch relevanten Glykoproteinen im Großmaßstab sind diese cgl-Pflanzen deshalb weniger geeignet. Als Alternative wären Kultursorten, insbesondere Solanaceen, wie z.B. Kartoffel, Tabak, Tomate oder Paprika, und des weiteren Luzerne, Raps, Rüben, Soja, Salat, Mais, Reis, und Getreide, mit fehlender oder stark gedrosselter GnTI-Aktivität ideal zur Produktion von heterologen Glykoproteinen in Pflanzen. Dazu würden sich Verfahren des "homology-dependent gene silencing" (Ref. 16,17) anbieten.

Wie Fig. 3 zeigt, ist die Homologie der ersten ermittelten pflanzlichen GntI-Sequenz aus Kartoffel (Solanum tuberosum L., St) im Vergleich mit den entsprechenden bekannten Sequenzen aus tierischen Organismen außerordentlich niedrig (nur 30-40% Identität auf Proteinebene, vgl. Fig. 3A), so daß eine effiziente Drosselung der endogenen "komplexen" Glykoproteinmodifikation in Pflanzen mittels "antisense" bzw. "sense"-Suppression (Ref. 21) durch die Verwendung bereits bekannter heterologer GntI-Gen-sequenzen mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht erreicht werden kann.

Für Medizin und Forschung besteht daher nach wie vor ein Bedarf, rekombinante Glykoproteine mit minimalen und einheitlichen, also definierten Zuckerresten in geeigneten Organismen kostengünstig herstellen zu können.

Wesen der Erfindung:

Nachdem die Anmelderin erstmals pflanzliche *GntI*-cDNA-Sequenzen isolieren und aufklären konnte, ist es nun u.a. möglich, beliebige Pflanzen mit gedrosselter oder fehlender GnTI-Aktivität zu gewinnen, insbesondere herzustellen, bzw. entsprechende Mutanten durch revers-genetische Ansätze nach Transposon-(Ref. 18) bzw. T-DNA-Insertion (Ref. 19) aufzuspüren, um in diesen dann Glykoproteine mit niedrigem Antigenpotential zu produzieren.

i) Enzyme:

Die Erfindung umfaßt allgemein verschiedene N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzyme (EC 2.4.1.101) aus Pflanzen, z.B. aus Kartoffel (Solanum tuberosum L.), Tabak (Nicotiana tabacum L.) und Arabidopsis thaliana. Insbesondere betrifft die Erfindung die Enzyme, die die in Fig. 2 und 3B sowie in dem beigefügten Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen aufweisen oder enthalten.

Von der Erfindung umfaßt sind ferner von den Aminosäuresequenzen der genannten Enzyme durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion, -modifikation oder durch C- und/oder N-terminale Verkürzung und/oder Verlängerung abgeleitete Enzyme, die, sofern sie enzymatische Aktivität zeigen, eine dem Ausgangsenzym vergleichbare Spezifität, also N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität, sowie ggf. vergleichbare Aktivität aufweisen.

Unter einer vergleichbaren Aktivität wird im vorliegenden Zusammenhang eine Aktivität verstanden, die bis zu 100% über oder unter der Aktivität des Ausgangsenzyms liegt. Von der Erfindung sind dementsprechend auch abgeleitete Enzyme oder Proteine mit sehr geringer oder vollständig fehlender enzymatischer Aktivität, nachweisbar mittels eines oder mehrerer der nachfolgend angegebenen Tests, umfaßt. Zum Nachweis der Enzymaktivität dient ein Standard-Test, der mit Mikrosomen-Fraktionen entweder radioaktiv, z.B. mit UDP-[6-3H]GlcNac als Substrat (Ref. 13), oder nicht-radioaktiv (HPLC-Methode; Ref. 20) durchgeführt wird. Pflanzliche GnTI-Aktivität kann subzellulär in Golgi-Fraktionen nachgewiesen werden (Ref. 21). Enzymanreicherungen aus Pflanzen sind aufgrund der geringen Ausbeuten jedoch nahezu unmöglich.

Gegebenenfalls alternativ kann ein erfindungsgemäßes abgeleitetes Enzym als ein Enzym definiert werden, für das eine das Enzym kodierende DNA-Sequenz ermittelt oder abgeleitet werden

kann, die mit der das Ausgangsenzym kodierenden DNA-Sequenz bzw. der dazu komplementären Sequenz unter stringenten Bedingungen, wie sie nachfolgend definiert werden, hybridisiert.

Ein dergestalt abgeleitetes Enzym stellt beispielsweise eine Isoform dar, die die Aminosäuren 74 bis 446 der in Fig. 2 und SEQ ID NO: 1 und 2 angegebenen Aminosäuresequenz umfaßt. Dieser Isoform fehlt u.a. der durch die Aminosäuren 10 bis 29 gebildete Membrananker, so daß diese Enzym-Isoform möglicherweise aufgrunddessen im Cytosol der Pflanze lokalisiert ist.

Als Beispiele für C- und/oder N-terminal verlängerte Proteine können Fusionsproteine genannt werden, die neben einer erfindungsgemäßen Aminosäuresequenz ein weiteres Protein umfassen, das beispielsweise eine andersartige enzymatische Aktivität aufweist oder auf andere Weise, z.B. aufgrund von Fluoreszenz oder Phosphoreszenz oder aufgrund einer Reaktivität mit spezifischen Antikörpern oder durch Binden an entsprechende Affinitätsmatrices, leicht nachweisbar ist.

Die Erfindung umfaßt gleichfalls Fragmente der genannten Enzyme, die ggf. keine enzymatische Aktivität mehr aufweisen. Diese Fragmente zeigen in der Regel jedoch antigene Wirkung in einem damit immunisierten Wirt und können folglich als Antigen zur Erzeugung monoklonaler oder polyklonaler Antikörper durch Immunisierung eines Wirtes mit diesen eingesetzt werden.

 $\Box J$

Die Erfindung betrifft darüberhinaus auch N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzyme insbesondere aus anderen Varietäten und Pflanzenarten, die zugänglich sind aufgrund der Hybridisierung ihrer Gene oder eines oder mehrerer Abschnitte ihrer Gene mit einer oder mehreren der nachfolgend erläuterten erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und/oder DNA-Fragmente und/oder mit geeigneten erfindungsgemäßen Hybridisierungssonden, die ausgehend von den im Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes hergestellt werden können.

Von der Erfindung umfaßt sind ferner nach den vorstehend erläuterten Maßgaben von diesen N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzymen abgeleitete Enzyme oder Proteine, einschließlich Fusionsproteinen von diesen, sowie Fragmente aller dieser Enzyme oder Proteine.

ii) Antikörper

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung der vorstehend genannten Aminosäuresequenzen bzw. von antigen wirksamen Fragmenten davon zur Erzeugung von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern oder -seren durch Immunisierung von Wirten mit diesen Aminosäuresequenzen bzw. Fragmenten sowie Antikörper bzw. -seren an sich, die die vorstehend erläuterten Enzyme und/oder Antigene spezifisch erkennen und binden. Die allgemeine Vorgehensweise und die entsprechenden Techniken zur Erzeugung polyklonaler und monoklonaler Antikörper sind dem Fachmann gleichfalls wohlbekannt.

Beispielhaft wurde rekombinantes GnTI-Protein aus $Solanum\ tu-berosum\ mit\ 10\ N-terminalen\ Histidin-Resten\ ("His-tag")\ durch\ Verwendung\ eines\ Fragments\ der\ in\ Fig.\ 2\ und\ SEQ\ ID\ NO:\ 1\ dargestellten\ GntI-cDNA\ (Nukleotide\ 275\ bis\ 1395)\ in\ E.\ coli\ überexprimiert\ und\ nach\ Affinitätsreinigung\ über\ eine\ Metall-Chelat-Matrix\ als\ Antigen\ zur\ Erzeugung\ von\ polyklonalen\ Antiseren\ in\ Kaninchen\ eingesetzt\ (vgl.\ Beispiele\ 5\ und\ 6)\ .$

Eine Anwendungsmöglichkeit der erfindungsgemäßen Antikörper besteht für das "Screenen" von Pflanzen auf das Vorhandensein von N-Acetylglucosaminyltransferase I.

Eine Bindung des erfindungsgemäßen Antikörpers an pflanzliche(s) Protein(e) zeigt das Vorliegen eines mit diesem Antikörper nachweisbaren N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzyms an. In einem späteren Schritt kann dieser Antikörper darüberhinaus, in der Regel dann kovalent an einen Träger gebunden,

gegebenenfalls auch zur Anreicherung oder Reinigung des Enzyms mittels Säulenchromatographie eingesetzt werden.

Ein negatives Bindungsergebnis mit dem erfindungsgemäßen Antikörper, d.h. fehlende Bindung an die pflanzlichen Proteine,
läßt wiederum auf ein fehlendes (oder durch Mutation stark verändertes) N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzym und damit auf
fehlende oder stark verminderte N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität in einer untersuchten Pflanze schließen.

Techniken zum Ausführen der vorstehend angesprochenen "Screening"-Tests oder zur Enzymanreicherung bzw. -reinigung unter Einsatz von Antikörpersäulen oder anderen Affinitätsmatrices (vgl. Beispiele 5 und 6) sind dem Fachmann wohlbekannt.

iii) DNA-Sequenzen

Die Erfindung umfaßt ferner DNA-Sequenzen, die die erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen, einschließlich davon gemäß den vorstehenden Maßgaben abgeleitete Aminosäuresequenzen kodieren. Insbesondere betrifft die Erfindung das den in den Figuren 2 und 3B und im Sequenzprotokoll aufgeführten Aminosäuresequenzen jeweils zugrundeliegende Gen, und ganz besonders die in Fig. 2 und im Sequenzprotokoll aufgeführten cDNA-Sequenzen, sowie von diesen Genen und DNA-Sequenzen abgeleitete DNA-Sequenzen.

Unter abgeleiteten DNA-Sequenzen werden Sequenzen verstanden, die durch Substitution, Deletion und/oder Insertion von einzelnen oder mehreren und/oder kleineren Gruppen von Nukleotiden der vorstehend angegebenen Sequenzen und/oder durch Verkürzung oder Verlängerung am 5'- und/oder 3'-Ende erhalten werden. Die Modifizierungen innerhalb der DNA-Sequenz können zu abgeleiteten DNA-Sequenzen führen, die identische Aminosäuresequenzen verglichen mit der von der Ausgangs-DNA-Sequenz kodierten Aminosäuresequenz kodieren, oder aber auch zu solchen, bei denen einzelne oder einige wenige Aminosäuren gegenüber der Aminosäuresequenz, die die Ausgangs-DNA-Sequenz kodiert, verändert,

d.h. substituiert, deletiert und/oder insertiert sind, oder auch solchen, die - ggf. zusätzlich - C- und/oder N-terminal verkürzt und/oder verlängert sind.

Die Erfindung erstreckt sich gleichfalls auf die zu den erfindungsgemäßen Genen und DNA-Sequenzen komplementären Sequenzen sowie auf deren RNA-Transkriptionsprodukte.

Von der Erfindung umfaßt sind insbesondere sämtliche, nach den vorstehend angegebenen Maßgaben abgeleiteten Sequenzen, die unter stringenten Bedingungen mit den oben erläuterten Ausgangssequenzen oder den dazu komplementären Sequenzen oder Teilen davon hybridisieren, wie auch DNA-Sequenzen, die derartige Sequenzen umfassen.

Als Hybridisierung unter stringenten Bedingungen im Sinne der Erfindung wird eine Hybridisierung bei Vorgehensweise gemäß einem oder mehreren der nachstehend angegebenen Verfahren verstanden. Hybridisieren: Bis zu 20 Std. in PEG-Puffer nach Church und Gilbert (0,25 M Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 1% (w/v) BSA, 7% (w/v) SDS, pH 7,5 mit Phosphorsäure; Ref. 22) bei 42°C oder in Standard-Hybridisierungspuffern mit Formamid bei 42°C oder ohne Formamid bei 68°C (Ref. 23). Waschen: 3-mal 30 min bei 65°C in 3-fach SSC-Puffer (Ref. 23), 0,1% SDS.

Im Rahmen der vorliegenden Anmeldung ist der Begriff "Hybridisierung" stets als Hybridisierung unter stringenten Bedingungen, wie vorstehend angegeben, zu verstehen, auch wenn dies im Einzelfall nicht explizit angegeben ist.

Darüberhinaus erstreckt sich die Erfindung auch auf Fragmente der vorstehend erläuterten DNA-Sequenzen, einschließlich der nach den vorstehenden Maßgaben abgeleiteten DNA-Sequenzen, auf von derartigen Fragmenten durch Nukleinsäuresubstitution, -insertion und/oder -deletion abgeleitete Fragmente sowie auf die entsprechenden Fragmente mit dazu komplementären Sequenzen. Derartige Fragmente sind u.a. als Sequenzierungs- oder PCR-

Primer, "Screening"-Sonden und/oder für Verwendungen, wie sie nachfolgend erläutert werden, geeignet. Für eine Verwendung als "Screening"- oder Hybridisierungssonde werden die erfindungsgemäßen DNA-Fragmente häufig radioaktiv markiert eingesetzt. Fragmente mit Sequenzen, die von den vorstehend definierten Ausgangssequenzen durch Substitution, Deletion und/oder Insertion von einem oder mehreren Nukleotiden abgeleitet sind, bzw. die dazu komplementären Sequenzen sind in dem Umfange von der Erfindung umfaßt, als sie unter den vorstehend angegebenen stringenten Bedingungen mit den Ausgangssequenzen bzw. den dazu komplementären Sequenzen hybridisieren.

Erfindungsgemäße DNA-Fragmente können beispielsweise auf der Grundlage der im Sequenzprotokoll und in Figur 2 angegebenen DNA-Sequenzen ausgehend von pflanzlicher DNA mittels Restriktionsendonukleasen unter Nutzung geeigneter Restriktionsschnittstellen oder durch Einsatz von PCR mittels geeignet synthetisierter Primer erhalten oder alternativ auch chemisch synthetisiert werden. Derartige Techniken sind dem Fachmann wohlbekannt.

Die Erfindung betrifft darüberhinaus auch jegliche DNA-Sequenzen, die ein Gen darstellen oder Teil eines Gens sind, das das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I kodiert, und die in ihrer Gesamtheit oder in einem Teilabschnitt

- mit einer der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und/oder
- mit einem oder mehreren der erfindungsgemäßen DNA-Fragmente und/oder
- mit einer DNA-Sequenz, die von den im Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes abgeleitet worden ist, unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

Als DNA-Fragmente werden hierzu Hybridisierungs- oder "Screening"-Sonden eingesetzt, die üblicherweise mindestens 15 Nukleotide, typischerweise zwischen 15 und 30 Nukleotide, gegebenenfalls aber auch wesentlich mehr, umfassen. Es können dafür

beispielsweise die in Beispiel 1 eingesetzten Primer Verwendung finden. Alternativ können DNA-Sequenzen geeigneter Länge, abgeleitet von den im Sequenzprotokoll angegebenen DNA-Sequenzen, eingesetzt werden. Als dritte Möglichkeit können geeignete erfindungsgemäße Hybridisierungssonden ausgehend von den im Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes entwickelt werden.

In diesem Sinne sind Gegenstand der Erfindung auch N-Acetylglucosaminyltransferase I kodierende Gene, die insbesondere aus
anderen Varietäten oder Pflanzenarten aufgrund ihrer Hybridisierung mit den vorstehend angegebenen Hybridisierungssonden
aufgefunden werden können, sowie davon gemäß den vorstehend erläuterten Maßgaben abgeleitete DNA-Sequenzen, DNA-Fragmente und
-Konstrukte.

Die Isolierung des jeweiligen Gens und die Sequenzierung desselben nach der Auffindung mittels der erfindungsgemäßen Hybridisierungssonden liegen im Bereich der Fähigkeiten eines Fachmanns auf diesem Gebiet und sind exemplarisch in den Beispielen
für N-Acetylglucosaminyltransferase I aus Solanum tuberosum und
die entsprechenden Enzyme aus Nicotiana tabacum und Arabidopsis
thaliana erläutert.

Gegenstand der Erfindung sind schließlich auch "antisense"-Sequenzen bezüglich jeglichen vorstehend erläuterten DNA-Sequenzen.

iv) Konstrukte

Von der Erfindung werden auch Konstrukte umfaßt, die ggf. neben zusätzlichen 5'- und/oder 3'-Sequenzen, z.B. Linkern und/oder regulatorischen DNA-Sequenzen, oder andersartigen Modifikationen die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, einschließlich der wie vorstehend ausgeführt abgeleiteten DNA-Sequenzen, umfassen.

Ein Beispiel hierfür sind Hybridisierungs- oder "Screening"Sonden, die zusätzlich zu einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz
noch ein in diesem Fall meist nichtradioaktives Nachweismittel
für die Detektion von Hybridisierungsprodukten umfassen, z.B.
fluoreszierende oder phosphoreszierende Moleküle, Biotin, Biotinderivate, Digoxigenin und Digoxigeninderivate. Es kommen in
diesem Zusammenhang jedoch auch radioaktive oder nichtradioaktive Nachweismittel, die z.B. durch Endmarkierung an die erfindungsgemäße DNA-Sequenz angeheftet werden können, in Betracht.

Gegenstand der Erfindung sind auch "antisense"- und "sense"-Konstrukte bezüglich der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und -Fragmente, nämlich bezüglich

- der im Sequenzprotokoll angegebenen DNA-Sequenzen und der zugrundeliegenden Gene,
- der davon nach den vorstehenden Maßgaben abgeleiteten DNA-Sequenzen,
- eines oder mehrerer Abschnitte dieser DNA-Sequenzen,
- DNA-Sequenzen insbesondere aus anderen Varietäten oder Pflanzenarten, die ein Gen darstellen oder Teil eines Gens sind, welches das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I kodiert, und die
 - -- mit einer der vorstehend genannten DNA-Sequenzen und/oder
 - -- mit einem oder mehreren der vorstehend genannten DNA-Fragmente und/oder
 - -- mit einer DNA-Sequenz, die von den im Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes abgeleitet worden ist,

unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

11

Des weiteren erstreckt sich die Erfindung auch auf jegliche DNA-Übertragungsysteme, wie Vektoren, Plasmide, Viren- und Phagengenome oder Cosmide, die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, z.B. das *GntI*-Gen, erfindungsgemäße cDNA und DNA-Abschnitte, wie sie im Sequenzprotokoll angegeben sind, Frag-

mente davon, insbesondere "antisense"- oder "sense"-Konstrukte und/oder davon nach den vorstehenden Maßgaben abgeleitete DNA-Sequenzen, enthalten.

Diverse Techniken zur Gewinnung oder Synthese erfindungsgemäßer DNA, DNA-Fragmente, Konstrukte und Übertragungssysteme, z.B. ausgehend von pflanzlicher DNA durch Restriktion mittels Restriktionsendonukleasen, PCR-Amplifizierung unter Einsatz geeigneter Primer, ggf. gefolgt von Klonierung und zusätzlicher chemischer oder enzymatischer Modifizierung, sind dem Fachmann wohlbekannt.

Eine Anwendungsmöglichkeit von erfindungsgemäßen DNA-Hybridisierungssonden liegt im Nachweis von N-Acetylglucosaminyltransferase I-Genen in anderen Pflanzen als jenen, aus denen die im Sequenzprotokoll angegebenen DNA-Sequenzen erhalten wurden, oder im Nachweis von möglichen (weiteren) Isoformen des N-Acetylglucosaminyltransferase I-Gens in den Ausgangspflanzen Solanum tuberosum, Nicotiana tabacum und Arabidopsis thaliana.

Kann für das Hybridisierungsexperiment auf eine genomische Bank oder cDNA-Bank einer Pflanze zurückgegriffen werden, liefert ein positives Hybridisierungsergebnis bei einem derartigen "Screening" oder Durchmustern der jeweiligen Bank den Hinweis auf einen Klon oder einige wenige Klone, die die gesuchte Sequenz, das N-Acetylglucosaminyltransferase I-Gen, vollständig oder teilweise in Verbindung mit nur einer begrenzten Menge weiterer DNA aus dem Genom der Zielpflanze enthalten, was die Klonierung und Sequenzierung des Zielgens entsprechend erleichtert. Alternativ kann ausgehend von pflanzlicher DNA und geeigneten Konstrukten, sogenannten PCR-Primern, auch eine PCR-Amplifikation des Gens oder von Teilen desselben vorgenommen werden, um Klonierung und Sequenzierung zu vereinfachen.

Ein Einsatz erfindungsgemäßer Sequenzierungsprimer, die ausgehend von geeigneten Abschnitten der erfindungsgemäßen Sequenzen synthetisiert werden, ermöglicht z.B. eine genomische Sequen-

zierung ausgehend von der vollständigen, durch Restriktionsendonukleasen geschnittenen genomischen DNA einer Zielpflanze mittels der Church-Gilbert-Technik wie auch z.B. eine Sequenzierung auf cDNA-Ebene nach RT-PCR-Amplifikation der Gesamt-RNA der Zielpflanze (vgl. Bsp. 1).

Eine alternative Anwendungsmöglichkeit von erfindungsgemäßen DNA-Hybridisierungssonden, die von den im Sequenzprotokoll angegebenen DNA-Sequenzen abgeleitet sind, besteht in der erfindungsgemäßen Verwendung derselben zum Nachweis von Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität. Das Hybridisierungsexperiment dient zur Detektion des Gens der N-Acetylglucosaminyltransferase I (GntI) und erlaubt z.B. aufgrund eines negativen Hybridisierungsergebnisses unter stringenten Bedingungen den Rückschluß auf ein Fehlen des GntI-Gens und damit fehlende N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität in einer untersuchten Pflanze.

Derartige Hybridisierungstechniken zum Nachweis von Proteinen oder Genen insbesondere in Pflanzenmaterial mittels DNA-Sonden sind dem Fachmann ebenfalls geläufig. Es wird in diesem Zusammenhang auf die vorstehenden Ausführungen zu möglichen Hybridisierungsbedingungen unter Punkt iii) verwiesen. Geeignete DNA-Hybridisierungssonden umfassen in der Regel mindestens 15 Nukleotide mit einer Sequenz, die z.B. von den in Fig. 2 und im Sequenzprotokoll angegebenen cDNA-Sequenzen oder den entsprechenden GntI-Genen abgeleitet ist.

v) Transformierte Mikroorganismen

Die Erfindung erstreckt sich des weiteren auf Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien, Bakteriophagen, Viren, einzellige eukaryotische Organismen, wie Pilze, Hefen, Protozoen, Algen und humane, tierische und pflanzliche Zellen, die durch eine oder mehrere der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder eines oder mehrere der erfindungsgemäßen Konstrukte, wie vorstehend erläutert, transformiert wurden.

Verwendung finden erfindungsgemäße transformierte Mikroorganismen beispielsweise als Expressionssysteme für die transformierende Fremd-DNA zur Gewinnung der entsprechenden Expressionsprodukte. Typische Mikroorganismen für diese Zwecke sind Bakterien, wie beispielsweise *E. coli*. Des weiteren können erfindungsgemäße transformierte Mikroorganismen, insbesondere Agrobakterien, z.B. zur Transformation von Pflanzen unter Weitergabe der transformierenden Fremd-DNA eingesetzt werden.

Verfahren zur Transformation von Mikroorganismenzellen durch (Fremd-) DNA sind dem Fachmann wohlbekannt.

Hierfür werden z.B. als Expressionsvektoren bezeichnete Konstrukte eingesetzt, die die erfindungsgemäße DNA-Sequenz unter Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren, ggf. zusätzlich gewebespezifischen Promotors enthalten, um eine Expression der eingeschleusten DNA in der Ziel- oder Wirtszelle zu ermöglichen.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist dementsprechend ein Verfahren zur Gewinnung der erfindungsgemäßen Enzyme und Proteine unter Einsatz eines oder mehrerer der erfindungsgemäßen transformierten Mikroorganismen. Das Verfahren umfaßt, mindestens einen durch erfindungsgemäße DNA, insbesondere eine der im Sequenzprotokoll angegebenen cDNAs, unter Kontrolle eines aktiven Promotors transformierten Mikroorganismus, wie vorstehend definiert, zu züchten und das erfindungsgemäße Enzym aus den Mikroorganismen und gegebenenfalls auch dem Kulturmedium zu isolieren. Das Verfahren erstreckt sich selbstverständlich auch auf die Gewinnung von den erfindungsgemäßen Enzymen aus Solanum tuberosum, Nicotiana tabacum und Arabidopsis thaliana abgeleiteten Enzymen bzw. Proteinen, wie sie vorstehend unter i) definiert sind.

Verfahren zur Züchtung transformierter Mikroorganismen sind dem Fachmann wohlbekannt. Die Isolierung des exprimierten Enzyms

kann beispielsweise gemäß dem in Beispiel 5 beschriebenen Verfahren mittels Metall-Chelat-Chromatographie oder alternativ durch Chromatographie an Säulen, die gegen das Enzym gerichtete Antikörper an das Packungsmaterial gebunden enthalten, erfolgen.

vi) Transgene Pflanzen

Die Erfindung umfaßt gleichfalls transgene Pflanzen, die mittels einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz bzw. eines entsprechenden Konstrukts transformiert worden sind. Es können so z.B. transgene Pflanzen erhalten werden, bei denen eine GnTI-Defizienz, z.B. aufgrund eines fehlenden oder schadhaften GntI-Gens oder aufgrund von Defekten in den regulatorischen Bereichen dieses Gens, durch Komplementierung durch ein von den im Sequenzprotokoll angegebenen cDNA-Sequenzen abgeleitetes Konstrukt, dessen Expression unter Kontrolle eines aktiven konstitutiven oder induzierbaren, ggf. zusätzlich gewebespezifischen Promotors steht, beseitigt worden ist. Das aufgrund der in dem Konstrukt enthaltenen erfindungsgemäßen DNA exprimierte GnTI-Enzym oder Protein mit GnTI-Aktivität komplementiert in diesem Falle die in der Ausgangspflanze fehlende GnTI-Aktivität.

Gleichfalls in Betracht gezogen werden transgene Pflanzen, in denen die in der Ausgangspflanze bereits vorhandene GnTI-Aktivität durch zusätzliche Expression des durch ein erfindungsgemäßes Konstrukt eingeschleusten GntI-Transgens erhöht ist. Ein bei der Untersuchung des Enzyms N-Acetylglucosaminyltransferase I in Pflanzen bestehendes Hauptproblem war bislang die überaus geringe Expression des GntI-Gens in vivo, verbunden mit einer überaus geringen Enzymaktivität, die entsprechend schwer nachzuweisen war. Durch Coexpression einer erfindungsgemäßen DNA kann das Problem zu geringer GnTI-Enzymaktivität bei Pflanzen behoben werden.

In diesem Falle kann es bevorzugt sein, für die Transformation von Pflanzen erfindungsgemäße DNA einzusetzen, die zusätzlich

einen Sequenzabschnitt umfaßt, der nach Expression eine vereinfachte Detektierung und/oder Anreicherung bzw. Reinigung des Proteinproduktes mit GnTI-Aktivität ermöglicht. Beispielsweise gelingt dies durch Einsatz einer speziellen DNA-Sequenz für die Expression eines rekombinanten GnTI-Enzyms, die eine N- oder Cterminale Sequenzverlängerung trägt, die einen Affinitätsmarker kodiert. Ist zusätzlich ein Aminosäuresequenzabschnitt zwischen GnTI-Enzym und Affinitätsmarker vorgesehen, der eine Erkennungsstelle für eine spezifische Protease darstellt, kann durch nachträglichen Einsatz dieser spezifischen Protease die N- oder C-terminale Sequenzverlängerung von dem GnTI-Enzym abgespalten und das GnTI-Enzym dadurch isoliert erhalten werden.

Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz, die das rekombinante GnTI-Enzym mit einer C-terminalen Sequenzverlängerung, die den Affinitätsmarker AWRHPQFGG ("Strep-tag"; Ref. 39) kodiert, und einer dazwischenliegenden Protease-Erkennungsstelle, IEGR, kodiert. Die Expression der erfindungsgemäßen DNA liefert GnTI-Enzyme mit der angegebenen C-terminalen Sequenzverlängerung, über welche die exprimierten Proteinmoleküle spezifisch an eine Streptavidin-derivatisierte Matrix binden und so isoliert werden können. Mittels der die Aminosäuresequenz IEGR spezifisch erkennenden Protease Faktor Xa kann der GnTI-Anteil der Proteinmoleküle dann freigesetzt werden. Alternativ kann das vollständige Protein von der Streptavidin-derivatisierten Matrix mittels Biotin oder Biotinderivaten abgelöst werden.

Ein weiteres Beispiel stellen erfindungsgemäße DNA-Sequenzen dar, die ein Protein kodieren, das zusätzlich zu einem GnTI-Enzym eine Mehrzahl, z.B. 10, N-terminal angefügte Histidin-Reste ("His-tag") umfaßt. Eine Isolierung bzw. Reinigung der exprimierten Proteine kann aufgrund der N-terminalen Histidin-Reste leicht durch Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (z.B. Ni-Sepharose) erfolgen (vgl. auch Beispiel 5).

Die Erfindung umfaßt gleichfalls Teile derartiger transgener Pflanzen, entsprechend transformierte Pflanzenzellen, transgene Samen und transgenes Vermehrungsmaterial.

Ein weiterer zentraler Aspekt der Erfindung ist die Verwendung der vorstehend erläuterten Sequenzinformation zur Gewinnung von Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität.

Die Möglichkeiten zum Auffinden von Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität aufgrund eines Gendefektes oder fehlenden Gens durch Einsatz erfindungsgemäßer Antikörper oder erfindungsgemäßer "Screening"-oder Hybridisierungssonden wurden vorstehend bereits beschrieben.

Zwei weitere Möglichkeiten bestehen in der erfindungsgemäßen Verwendung von "antisense"- bzw. "sense"-DNA-Konstrukten, die von der DNA-Sequenz eines GntI-Gens einer Pflanze abgeleitet sind, zur Erzeugung transgener Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität mittels "homology-dependent gene silencing" (vgl. Ref. 16,17). Die DNA-Sequenz, auf die zur Erzeugung der Konstrukte als Ausgangssequenz zurückgegriffen wird, kann dabei von der zu transformierenden Ausgangspflanze selbst oder aber auch von einer anderen Pflanzenvarietät oder -art stammen. Insbesondere finden "antisense"- oder "sense"-Konstrukte, wie sie vorstehend unter den Punkten iii) und iv) erläutert wurden, Verwendung. Die eingesetzten Konstrukte umfassen üblicherweise mindestens 50 bis 200 und mehr Basenpaare.

Insbesondere umfassen die hierfür eingesetzten Konstrukte mindestens 50 bis 200 und mehr Basenpaare mit einer Sequenz, die ausgehend

 von den im Sequenzprotokoll angegebenen cDNA-Sequenzen und/oder den entsprechenden GntI-Genen und/oder

- von den vorstehend erläuterten erfindungsgemäßen abgeleiteten DNA-Sequenzen und/oder DNA-Fragmenten und/oder
- von DNA-Sequenzen insbesondere aus anderen Varietäten und Pflanzenarten, die N-Acetylglucosaminyltransferase I kodieren und aufgrund einer Hybridisierung mit Hybridisierungsoder "Screening"-Sonden, wie sie vorstehend unter Punkt iii) und iv) definiert wurden, unter stringenten Bedingungen aufgefunden werden können, abgeleitet wird.

Die Konstrukte enthalten in der Regel einen starken konstitutiven oder induzierbaren, ggf. zusätzlich gewebespezifischen Promotor, unter dessen Kontrolle die "antisense"- oder "sense"- DNA-Sequenzabschnitte stehen.

Bei der Erzeugung transgener Pflanzen durch Integration von "antisense"-Konstrukt(en) in das Pflanzengenom oder durch virale Infektion von Ausgangspflanzen oder -pflanzenzellen durch "antisense"-Konstrukt(e) enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Transkription des "antisense"-Konstrukts oder der "antisense"-Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe ist beabsichtigt, auf RNA-Ebene eine Hybridisierung von Transkripten des GntI-Gens mit Transkripten des "antisense"-DNA-Abschnitts zu erzielen, die die Translation der GntI-mRNA verhindert. Die Folge ist eine transgene Pflanze mit stark verringerten Gehalten an N-Acetylglucosaminyltrans-ferase I und damit einer stark verringerten entsprechenden Enzymaktivität.

Für die erfindungsgemäße Transformation von Pflanzen mit "antisense"-Konstrukten können beispielsweise Konstrukte eingesetzt werden, die mit einer der kompletten, in Fig. 2 und im Sequenzprotokoll aufgeführten cDNAs oder entsprechenden, in der Regel mindestens 50 bis über 200 Basenpaare umfassenden Abschnitten derselben hybridisieren. Insbesondere bevorzugt ist darüberhinaus die Verwendung von Fragmenten, deren Transkripte zusätzlich zu einer Hybridisierung mit einem Teil des 5'- untranslatierten Bereiches der GntI-mRNA führen, an dem oder in

dessen Nähe sich normalerweise die Anheftung der Ribosomen vollziehen würde. Beispiele für derartige Konstrukte sind in Fig. 4 gezeigt.

Angesichts des Vorkommens einer Isoform in Solanum tuberosum mit wahrscheinlich cytoplasmatischer Lokalisierung aufgrund des fehlenden Membranankers (As 10 bis 29) mit noch unbekannter Funktion kann es wünschenswert sein, lediglich das N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzym zu erfassen, das in den Golgi-Zisternen lokalisiert ist, d.h. nur jenes Enzym, das den Membrananker umfaßt. Ein Grund für diesen Wunsch kann das Bestreben oder im Einzelfalle auch die Notwendigkeit sein, den cytoplasmatischen Metabolismus der Pflanzenzelle, für den die cytoplasmatische N-Acetylglucosaminyltransferase I womöglich von Bedeutung ist, so wenig als möglich zu beeinträchtigen. Zu diesem Zweck können erfindungsgemäß "antisense"-Konstrukte eingesetzt werden, die bzw. deren Transkripte mit einem DNA- oder RNA-Abschnitt des GntI-Gens oder der GntI-mRNA hybridisieren, der einen Teil des 5'-untranslatierten Bereichs und den kodierenden Bereich - einschließlich des Membranankers - umfaßt. Eine Erstreckung des Hybridisierungsbereiches bis Position 266 der cDNA in Fig. 2 und SEQ ID NO: 1 wird in der Regel für den genannten Zweck als unschädlich erachtet.

Bei der Erzeugung transgener Pflanzen durch Integration von "sense"-Konstrukten in das Pflanzengenom oder durch virale Infektion von Ausgangspflanzen oder -pflanzenzellen durch "sense"-Konstrukt(e) enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Expression des oder der Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe wird in Anlehnung an die Arbeiten von Faske et al. (Ref. 17) in Tabak von Hybridisierungsphänomenen dieser Konstrukte mit dem endogenen GntI-Gen auf posttranskriptionaler bzw. auf DNA-Ebene ausgegangen, die letzlich die Translation des GntI-Gens beeinträchtigen oder verhindern. Das Resultat sind auch in diesem Falle transgene Pflanzen mit verminderter oder sogar fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität.

* 3 - 5

Verfahren zur stabilen Integration derartiger "antisense"- und "sense"-Konstrukte in das Genom von Pflanzen bzw. zur viralen Infektion von Pflanzen bzw. Pflanzenzellen für eine extrachromosomale Propagation und Transkription/Expression derartiger Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe sind dem Fachmann bekannt. Dazu gehören sowohl der direkte DNA-Transfer (z.B. in Protoplasten mittels Elektroporation oder durch Zusatz eines hochmolekularen Osmotikums sowie biolistische Methoden, bei denen DNA-umhüllte Teilchen in Pflanzengewebe geschossen werden) wie die Verwendung natürlicher Wirt/Vektor-Systeme (z.B. Agrobakterien oder Pflanzenviren). Für eine virale Infektion von Ausgangspflanzen oder -pflanzenzellen durch entsprechende Konstrukte enthaltende Viren für eine extrachromosomale Propagation und Transkription/Expression der Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe stehen eine Reihe spezieller Viren, wie Tabakmosaikvirus (TMV) oder Kartoffelvirus X (potato virus X), zur Verfügung.

Beispielhafte Pflanzen, die für eine derartige Integration in Frage kommen, umfassen dikotyledone wie monokotyledone Kulturpflanzen, insbesondere Solanaceen wie Kartoffel, Tabak, Tomate und Paprika. Zusätzlich wären Banane, Luzerne, Raps, Rüben, Soja, Salat, Mais, Reis und Getreide geeignete Zielpflanzen für den Einsatz homologer "antisense"-Konstrukte. Beispielsweise erscheint die im Sequenzprotokoll angegebene Sequenz aus Arabidopsis thaliana insbesondere als Ausgangssequenz für die erfindungsgemäße Transformation von Brassicaceen, wie z.B. Rapspflanzen, mittels "sense"- oder "antisense"-Konstrukten geeignet. Weitere Pflanzen von Interesse sind jegliche Pflanzen, die für Medizin und Forschung interessante Glykoproteine exprimieren.

Allgemein soll festgehalten werden, daß die erfindungsgemäße Transformation von Pflanzen, die in dem entsprechenden Bereich des *GntI*-Gens eine Homologie von ≥70% auf Nukleotidebene zu den eingesetzten erfindungsgemäßen "antisense"- oder "sense"-

Konstrukten aufweisen, in der Regel zu erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen führt, die die gewünschte Verringerung der N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität aufweisen.

Eine weitere Möglichkeit wird ferner in einer zielgerichteten Zerstörung ("Knock out") des N-Acetylglucosaminyltransferase I-Gens durch "gene targeting" mittels homologer Rekombination (Ref. 24) in einer Zielpflanze durch Einsatz eines geeigneten, von der erfindungsgemäßen cDNA-Sequenz abgeleiteten DNA-Fragments gesehen, ähnlich der Vorgehensweise, wie sie beispielsweise für Hefe-Systeme und Säuger etabliert worden ist.

Die Erfindung umfaßt ferner transgene Pflanzen, die mit den vorstehend angesprochenen "antisense"- oder "sense"-Konstrukten bzw. mit diese enthaltenden Viren transformiert worden sind, sowie Teile derartiger transgener Pflanzen, entsprechend transformierte Pflanzenzellen, transgene Samen und transgenes Vermehrungsmaterial.

Verfahren zur Erzeugung transgener Pflanzen, z.B. durch Agrobakterien- oder Virus-vermittelten, wie auch direkten DNA-Transfer, sind dem Fachmann geläufig. Hinsichtlich beispielhafter Pflanzen für eine derartige Transformation gilt das vorstehend ausgeführte.

Die erfindungsgemäßen bzw. erfindungsgemäß gewonnenen Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität können erfindungsgemäß zur Herstellung von Glykoproteinen mit minimalen und einheitlichen, also definierten Zuckerresten eingesetzt werden. Wie bereits erläutert, sind derartige Glykoproteine für Medizin und Forschung von großer Bedeutung. Als preiswerte Rohstoff- und Nahrungsquelle sowie durch ihre problemlose Entsorgung über Kompostierung stellen Pflanzen per se ideale Bioreaktoren dar. Gemäß der vorstehend erläuterten Erfindung können jetzt biotechnologisch oder pharmazeutisch relevante Glykoproteine (z.B. Therapeutika mit niedrigem Antigenpotential für Säuger) in Kulturpflanzen exprimiert

werden, in denen GnTI-Aktivität stark gedrosselt ist oder vollständig fehlt.

Die Erfindung umfaßt dementsprechend auch ein Verfahren zur Erzeugung von Glykoproteinen mit minimalen, einheitlichen und definierten Zuckerresten, umfassend das Züchten einer erfindungsgemäßen transgenen Pflanze, von Teilen derartiger Pflanzen oder von erfindungsgemäßen transformierten Pflanzenzellen, die jeweils das gewünschte Glykoprotein exprimieren, und das Isolieren des gewünschten Glykoproteins aus dem gezüchteten Material.

Beispielhafte Kulturpflanzen sind in diesem Zusammenhang Solanaceen, insbesonders Kartoffel, Tabak, Tomate, und Paprika. Des weiteren kommen Banane, Luzerne, Raps, Rüben, Soja, Salat, Mais, Reis und Getreide in Frage.

Die Sequenz der enzymatisch gesteuerten, pflanzenspezifischen N-Glykan-Modifikationen, denen sekretorische Glykoproteine bei Passage durch den Golgi-Apparat höherer Pflanzen unterliegen, ist in Fig. 1 schematisch dargestellt. Die Blockierung der Biosynthese durch fehlende oder unzureichende N-Acetylglucosaminyltransferase I-(GlcNac-Transferase I)-Aktivität in einer Pflanze führt dazu, daß anstelle "komplexer" Glykane hauptsächlich Glykane des MansGlcNAc2-Typs, also Glykoproteine mit einheitlichen und wohldefinierten Zuckerresten gebildet werden, die für Medizin und Forschung von überaus hoher Bedeutung sind.

Hierzu können die Gene für die gewünschten Glykoproteine in ihren natürlichen Erzeugerpflanzen exprimiert werden, die erfindungsgemäß z.B. mittels "antisense"- oder "sense"-Konstrukten zu transgenen Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität transformiert wurden.

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, erfindungsgemäße transgene Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität einzusetzen, die zusätzlich mit

dem Gen für das gesuchte Glykoprotein transformiert worden sind. Hierzu können Konstrukte eingesetzt werden, die das Gen für das gesuchte Glykoprotein unter der Kontrolle eines starken, konstitutiven oder induzierbaren, ggf. zusätzlich gewebespezifischen Promotors enthalten und die zu einer Integration des Gens in das Genom der Pflanze führen. Alternativ kann die Transformation auch durch virale Infektion durch ein das Gen für das gesuchte Glykoprotein enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Expression des Gens erfolgen. Das Glykoprotein kann dann in der jeweiligen Wirtspflanze exprimiert und daraus gewonnen werden.

Es kann dabei selbstverständlich alternativ auch so vorgegangen werden, daß zunächst eine Transformation mit einem Expressionskonstrukt oder Virus, das die kodierende DNA des Glykoproteins enthält, vorgenommen wird und erst danach eine weitere Transformation mit einem oder mehreren erfindungsgemäßen "antisense"- oder "sense"-Konstrukten oder einem oder mehreren Viren, die entsprechende DNA enthalten, erfolgt. Eine gleichzeitige Transformation mit beiden Konstrukten oder mit einem Virus, das sowohl das "antisense"- oder "sense"-Konstrukt als auch das das gesuchte Glykoprotein kodierende Gen enthält, ist ebenfalls möglich ("Huckepack"-Version).

Im Rahmen der Erfindung wird auch eine virale Überinfektion erfindungsgemäßer transgener Pflanzen, bei denen bereits eine Integration des "antisense"/"sense"-Konstrukts und/oder des das gesuchte Glykoprotein kodierenden Gens im Genom vorliegt, durch Viren, die "antisense"/"sense"-Konstrukt und/oder das das gesuchte Glykoprotein kodierende Gen enthalten, für eine zusätzliche extrachromosomale Propagation und Transkription bzw. Expression dieser DNA in Betracht gezogen. Hierdurch können die Konzentrationen an "antisense"- bzw. "sense"-DNA oder exprimiertem Glykoprotein in den transgenen Pflanzenzellen erhöht werden.

Für die erfindungsgemäße Gewinnung definiert glykosylierter Glykoproteine kann sich eine Verwendung gewebespezifischer Promotoren beispielsweise in Fällen als sinnvoll erweisen, wenn beabsichtigt ist, die gewünschten Glykoproteine nur aus bestimmten Pflanzenteilen, wie der Knolle oder den Wurzeln, zu gewinnen. Für eine ganze Reihe von Pflanzengeweben stehen heute gewebespezifische Promotoren zur Verfügung, die eine Expression von Fremdgenen speziell nur in diesen Geweben bewirken. Beispielhaft können hier knollenspezifische Promotoren, wie Patatin Klasse I- (Ref. 26) und Proteinase Inhibitor II-Promotoren (Ref. 27) aufgeführt werden. Beide Promotoren zeigen unter bestimmten Bedingungen ebenfalls Expression in Blattgewebe, d.h. können durch hohe Metabolitgehalte (wie z.B. Saccharose) und im Fall des Proteinase Inhibitor II-Promotors auch durch mechanische Verwundung oder Besprühen mit Abscisin- bzw. Jasmonsäure induziert werden.

Eine Verwendung gewebespezifischer Promotoren kann auch dann angezeigt sein, wenn sich die für die Transformation eingesetzte erfindungsgemäße DNA-Sequenz bzw. deren Transkriptions-oder Translationsprodukte für bestimmte Pflanzenteile als abträglich erweisen, z.B. durch negative Einwirkung auf den Metabolismus der entsprechenden Pflanzenzellen.

Als beispielhaftes Ziel-Glykoprotein kommt humane Glucocerebrosidase zur Therapie der erblichen "Gaucher"-Krankheit (Ref. 25) in Frage. Zur Gewinnung von humaner Glucocerebrosidase (GC) mit einheitlichen und definierten Zuckerresten können beispielsweise erfindungsgemäße mittels "antisense"-DNA transformierte Pflanzen mit dem Gen für humane Glucocerebrosidase transformiert werden. Dafür wird die cDNA-Sequenz für humane Glucocerebrosidase (Ref. 38) mittels PCR unter Verwendung genspezifischer Primer am 3'-Ende so modifiziert, daß das rekombinante Enzym eine C-terminale Sequenzverlängerung trägt, die einen Affinitätsmarker (z.B. AWRHPQFGG, "Strep-tag"; Ref. 39) und gegebenenfalls auch eine Protease-Erkennungsstelle (z.B. IEGR) zwischen GnTI-Enzymabschnitt und Affinitätsmarker kodiert. Die so

veränderte GC-cDNA-Sequenz wird unter Verwendung eines starken und ggf. gewebespezifischen Promotors (z.B. für Kartoffel unter Kontrolle des knollenspezifischen B33-Patatin-Promotors) in erfindungsgemäßen GntI-antisense-Pflanzen exprimiert, so daß das in diesen Pflanzen synthetisierte Enzym ausschließlich wohldefinierte N-Glykane trägt. Der Affinitätsmarker soll die Anreicherung des rekombinanten Enzyms aus den transgenen Pflanzen erleichtern. In diesem Falle binden die exprimierten Proteinmoleküle ("GC-Strep"-Moleküle) über die Affinitätsmarkersequenz an eine Streptavidin-derivatisierte Matrix und können von dieser mittels Biotin oder Biotinderivaten abgelöst werden. Die Ablösung von der Streptavidin-derivatisierten Matrix kann auch mittels katalytischer Mengen einer Protease erfolgen, die eine Spezifität für die zwischen dem GnTI-Enzymabschnitt und dem Affinitätsmarker befindliche Protease-Erkennungsstelle aufweist. In diesem Falle wird nur der GnTI-Enzymabschnitt von der Matrix abgelöst. Dies kann insbesondere in dem Falle von Vorteil sein, wenn die Affinitätsmarkersequenz eine nachteilige Wirkung auf die GnTI-Aktivität ausübt.

Die $Man_5GlcNAc_2$ -Glykane der aus den erfindungsgemäßen Pflanzen gewonnenen Glucocerebrosidase werden aufgrund ihrer terminalen Mannose-Reste von Makrophagen als Aufnahmesignal erkannt und können daher direkt zur Therapie der erblichen "Gaucher-Krankheit" eingesetzt werden. Eine Therapie ist derzeit nur durch aufwendige Isolierung und Deglykosylierung nativer Glucocerebrosidase möglich (Ref. 25).

Die Herstellung rekombinanter Glykoproteine läßt sich dementsprechend durch den Einsatz pflanzlicher *GntI*-Sequenzen im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren, z.B. der technisch aufwendigen chemischen Deglykosylierung gereinigter Glykoproteine
(Ref. 25) oder einer schwierigen und teuren Produktion in GnTIdefizienten tierischen Zellinien (Ref. 7,10), stark vereinfachen.

Erläuterung der Figuren:

- Fig. 1: Sequenz der pflanzenspezifischen N-Glykan-Modifikationen, denen sekretorische Glykoproteine bei Passage durch den Golgi-Apparat höherer Pflanzen unterliegen (Ref. 28). Der Biosyntheseblock zu "komplex"-modifizierten Glykanen beruht auf einem Defizit an GnTI-Aktivität (hervorgerufen entweder durch defektes oder fehlendes GnTI-Enzym oder durch effektive Drosselung der GntI-Genexpression) und ist durch ein Kreuz markiert. Bedeutung der Symbole: (F) Fucose-Reste, (X) Xy-lose-Reste, () GlcNac-Reste, () Mannose-Reste.
- Fig. 2: Vollständige cDNA-Sequenz einer pflanzlichen GnTI aus Kartoffel (Solanum tuberosum L.) und davon abgeleitete Aminosäuresequenz. Exemplarisch ist die vollständige cDNA der GntI-Isoform mit Membrananker aus Kartoffelblattgewebe (A1) dargestellt. Die EcoRI/NotI-Linker an den 5'- und 3'-Enden der cDNA sind durch Fettdruck hervorgehoben, die Bindestellen der für die RT-PCR-Sonde verwendeten degenerierten Oligonukleotide sind unterstrichen. Im Gegensatz zu bereits publizierten tierischen GnTI-Sequenzen enthält die abgeleitete Proteinsequenz der Kartoffel cDNA-Klone eine potentielle N-Glykosylierungsstelle: Asn-X(ohne Pro)-Ser/Thr, die mit einem Stern markiert ist. Die Region des Membranankers ist kursiv hervorgehoben (As 10 bis 29). Der Beginn der möglicherweise im Cytosol lokalisierten Isoform (A8) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.
 - Fig. 3: A, Identitäts- bzw. Ähnlichkeitsgrad der abgeleiteten Aminosäuresequenz einer vollständigen GntI-cDNA-Sequenz aus Kartoffel (A1) im Vergleich mit anderen, aus Datenbanken ausgewählten GnTI-Sequenzen tierischer Organismen. Identische Aminosäurepositionen (in %) sind fett gedruckt, ähnliche Aminosäurepositionen stehen in Klam-

mern darunter. Bedeutung der Kürzel: Hu, Mensch; Ra, Ratte; Mo, Maus; Ce, Caenorhabditis elegans (Spulwurm); St, Solanum tuberosum (Kartoffel).

B, Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen verschiedener pflanzlicher *GntI*-cDNA-Klone. A_Stb-Al, GnTI aus Kartoffelblatt; B_Ntb-A9, GnTI aus Tabakblatt (A9); C_Atb-Full, GnTI aus *Arabidopsis thaliana*. Identische As sind schwarz, ähnliche As hellgrau markiert.

Fig. 4: Klonierungsschema der verwendeten GntI-"antisense"-Konstrukte. In die SalI-Schnittstelle der Polylinkerregion des pflanzlichen Expressionsvektors pA35 (Ref. 29) wurde nach Auffüllen der Enden ein NotI-Linker eingeführt (= pA35N) und die vollständige Al-GntI-cDNA über NotI in pA35N inseriert. Das entsprechende "antisense"-Konstrukt (= pA35N-A1as) wurde über EcoRI und HindIII in den binären Vektor pBin19 (Ref. 30) inseriert. Des weiteren wurde nach PCR-Amplifikation ein ca. 270 Bp umfassendes 5'-Fragment der Al-GntI-cDNA über XbaI- und NotI-Schnittstellen in pA35N in "antisense"-Orientierung kloniert (= pA35N-A1-kurz) und ebenfalls in pBin19 inseriert. Abkürzungen: Zahlen in Klammern, Positionsangaben der Restriktionsschnittstellen in der Al-GntI-cDNA (in Basenpaaren); pBSK, Klonierungsvektor (Stratagene); pGEM3Z, Klonierungsvektor (Promega); CaMV p35S, konstitutiver Blumenkohl-Mosaikvirus-35S-Promotor; OCSpA, Octopinsynthase-Polyadenylierungssignal; pNOS, Nopalinsynthase-Promotor; NEO, Neomycinphosphotransferase (Selektionsmarker, vermittelt Kanamycinresistenz); NOSpA, Nopalinsynthase-Polyadenylierungssignal; LB/RB, "left/right border" der T-DNA des binären Vektors; Pfeil, Translationsstart (ATG); A8, Beginn der potentiell cytosolisch lokalisierten GntI-Isoform

(7 As-Austausche im Vergleich zu Al).

- Fig. 5: Ausmaß der Suppression komplexer Glykoprotein-Modifikation in transgenen Kartoffelpflanzen, die mit dem langen GntI-"antisense"-Konstrukt (vgl. Fig. 4) transformiert wurden. A, Coomassie-gefärbtes SDS-Gel von Blattextrakten; B, "Western-Blot"-Analyse (Ref. 13,33) von Parallelproben mit einem "complex-glycan"-Antiserum (Ref. 12,13). Die Spuren enthalten je 30 µg Gesamtprotein: cgl(Ara), Arabidopsis cgl-Mutante (Ref. 13); WT(Desi), Kartoffel Wildtyp; die Nummern bezeichnen einzelne transgene Kartoffelpflanzen, die Pfeile Molmassenstandards von 66, 45, 36 und 29 kD.
- Fig. 6: Nachweis der Spezifität des erzeugten GnTI-Antiserums nach Zellfraktionierung (Ref. 40) von Tabak-Kallusmaterial. Für die "Western Blot"-Analyse (Ref. 13, 33) wurden pro Spur je 30 µg Protein aufgetragen. Das Antiserum wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Spur 1, Homogenat nach Abtrennung von Zelltrümmern; Spur 2, Vesikel-Fraktion nach Säulenchromatographie; Spur 3, Saccharose-Gradient-Fraktion I (Mikrosomen); Spur 4, Saccharose-Gradient-Fraktion II (Plastiden); Spur 5, für die Immunisierung verwendetes Antigen (rekombinantes GnTI-Fusionsprotein; Pfeil, Molmasse von ca. 49 kD.

Erläuterung der im Text verwendeten Abkürzungen:

As, Aminosaure(n); Bp, Basenpaar(e); EMS, Ethylmethansulfonat (mutagene Chemikalie); F2, zweite Filialgeneration; Fuc, Fucose; Glc, Glucose; GlcNac, N-Acetylglucosamin; GnTI, N-Acetylglucosaminyltransferase I (EC 2.4.1.101); GntI, Gen für GnTI (Kern-codiert); kD, Kilodalton; Man, Mannose; PCR, Polymerasekettenreaktion; PAGE, Polyacrylamidgelelektrophorese; Ref., Referenz; RT-PCR, Reverse Transkription gekoppelt mit Polymerasekettenreaktion; SDS, Natriumdodecylsulfat; Var., Varietät; Xyl, Xylose.

Die Erfindung wird nun anhand von Beispielen eingehender erläutert. Die Beispiele werden lediglich zur Veranschaulichung der Erfindung aufgeführt und beschränken die Erfindung in keiner Weise.

Bsp. 1: Isolierung und Charakterisierung von pflanzlichen *GntI-*cDNA-Klonen.

Aus Kartoffel- und Tabak-Blattgewebe wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels RT-PCR in Kombination mit degenerierten Primern (Vorgehen analog zu Ref. 31), die von konservierten Aminosäurebereichen bekannter GnTI-Sequenzen aus tierischen Organismen abgeleitet wurden ("sense"-Primer 1*, 5'-TG(CT) G(CT)I (AT)(GC)I GCI TGG (AC)A(CT) GA(CT) AA(CT)-3'; "antisense"-Primer 3*, 5'-CCA ICC IT(AG) ICC (ACGT)G(CG) (AG)AA (AG)AA (AG)TC-3'; je 30 pMol Primer pro 50 μ l PCR-Ansatz bei 55°C "annealing"-Temperatur und 45 Zyklen), cDNA-Fragmente von ca. 90 Bp amplifiziert. Nach Gelelution wurden die Enden der PCR-Produkte repariert (d.h. durch DNA-Polymerase I glatte Enden erzeugt und mit T4-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert) und in die EcoRV-Schnittstelle von pBSK (Stratagene) kloniert. Die Identität der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Kartoffel und Tabak RT-PCR-Produkte konnte durch Vergleich mit bekannten GnTI-Sequenzen zwischen den Primern (Pfeile) als homolog bestätigt werden; \Rightarrow Q(R/M)QFVQDP(D/Y)ALYRS \Leftarrow (homologe As unterstrichen). Von je einem der Klone wurden mittels PCR radioaktiv markierte Sonden synthetisiert (Standard-PCR-Ansatz mit degenerierten Primern wie oben, Nukleotidmischung ohne dCTP, dafür mit 50 μ Ci α - 32 P-dCTP [>3000 Ci/mMol] versetzt) und verschiedene cDNA-Banken mit den entsprechenden homologen Kartoffel- bzw. Tabak-Sonden auf GntIhaltige Klone durchgemustert (Vorgehen analog zu Ref. 31; "stringente" Hybridisierungsbedingungen wurden bereits oben im Text definiert). Die cDNA-Banken wurden mit mRNA aus jungen, noch wachsenden Pflanzenteilen ("sink"-Gewebe) hergestellt. Nach cDNA-Synthese und Ligieren von EcoRI/NotI-Adaptoren (cDNA-Synthese-Kit, Pharmacia) wurde mit EcoRI-kompatiblen Lambda-Armen ligiert, diese verpackt und damit E. coli XL1-Blue-Zellen transfiziert (Lambda ZAPII Klonierungs- und Verpackungssystem, Stratagene). Nach Amplifikation der Banken wurde je ein vollständiger GntI-Klon aus einer Kartoffelblatt-"sink"-Bank (Al gemäß Fig. 2 und SEQ ID NO: 1) und einer Tabakblatt-"sink"-Bank (A9 gemäß SEQ ID NO: 3), sowie zwei weitere Klone aus einer Knollen-"sink"-Bank isoliert (A6,A8). Die abgeleiteten GnTI-Aminosäuresequenzen enthalten im Gegensatz zu denen von Tieren eine potentielle N-Glykosylierungsstelle, Asn-X(ohne Pro)-Ser/Thr. Eine der GntI-cDNA-Sequenzen aus Knollen trägt vor dem ersten Methionin Stop-Codons in allen drei Leserahmen (A8). Der codierende Bereich ist zu dem längeren Knollenklon (A6) stark homolog (nur 2 As-Austausche), trägt jedoch eine völlig andere 5'-untranslatierte Region. Des weiteren fehlt der für das Golgi-Enzym charakteristische Membrananker, so daß diese GntI-Isoform im Cytosol lokalisiert sein könnte. Sequenzvergleiche wurden mithilfe der "gap"- bzw. "pileup"- und "box"-Option des GCG-"software"-Pakets (J Devereux, P Haeberli, O Smithies (1984) Nucl Acids Res 12: 387-395) erstellt und zeigen, daß die abgeleiteten pflanzlichen GnTI-Aminosäuresequenzen zu denen aus tierischen Organismen nur 30-40% Identität und 57-59% Ähnlichkeit aufweisen (Fig. 3A), untereinander aber hoch homolog sind (75-90% Identität, Fig. 3B).

Bei Arabidopsis thaliana wurde analog vorgegangen, wobei zur Herstellung einer spezifischen Sonde zunächst eine GnTI-Teilsequenz durch RT-PCR mit GntI "sense"-Primer 4A (5'-ATCGGAAAGCTTGGATCC CCA GTG GC(AG) GCT GTA GTT GTT ATG GCT TGC-3'; HindIII-Schnittstelle unterstrichen, BamHI fett gedruckt) und "antisense"-Primer 3*, wie vorstehend definiert, amplifiziert wurde. Aus einer Phagenbank (Lambda Uni-ZAP) wurde mit dieser Sonde zunächst ein 5'-unvollständiger cDNA-Klon isoliert. Durch Vektor-Insert-PCR wurde das fehlende 5'-Ende aus einer weiteren Bank amplifiziert und über eine unique SpeI-Schnittstelle im 5'-Bereich zu einer vollständigen cDNA-Sequenz zusammengesetzt. Die durch Sequenzierung ermittelte Nukleinsäuresequenz ist in SEQ ID NO: 5 aufgeführt.

Bsp. 2: Funktionelle Komplementierung eines GnTI-Defekts mit GntI-cDNA bei transienter Expression in Protoplasten der Arabidopsis thaliana cgl-Mutante.

Ca. 4 Wochen nach Aussaat wurden Protoplasten aus Blättern steril angezogener cgl-Mutanten ("Nichtfärber"-Pflanzen nach 5 Rückkreuzungen, Ref. 13) isoliert und mit Expressionskonstrukten der vollständigen GntI-cDNA-Sequenzen (NotI-cDNA-Fragmente, vgl. Fig. 4) in "sense"- (pA35N-A1s bzw. pA35N-A9s) oder "antisense"-Orientierung (pA35N-A1as bzw. pA35N-A9as) transformiert und für 96 Std. bei Raumtemperatur abgedunkelt kultiviert (je 50 µg Plasmid-DNA pro 1 Mio. Protoplasten, PEG-Methode nach Ref. 32). Anschließende SDS-PAGE der Protoplastenextrakte und "Western Blot"-Analyse (analog zu Ref. 13,33) zeigte funktionelle Komplementierung des GnTI-Defekts, d.h. "komplexe" Glykosylierung zahlreicher Proteinbanden bei transienter Expression der Kartoffel Al- und Tabak A9-"sense"-, nicht aber der entsprechenden "antisense"-Konstrukte in Protoplasten der Arabidopsis cgl-Mutante (Daten nicht gezeigt).

Bsp. 3: Klonierung der binären Expressionskonstrukte pBin-35-Alas und pBin-35-Al-kurz (vgl. Fig. 4).

In die SalI-Schnittstelle der Polylinkerregion (entspricht pUC18) des pflanzlichen Expressionsvektors pA35 (Ref. 29) wurde nach Auffüllen der Enden ein NotI-Linker eingeführt (pA35N), und die vollständige Al-GntI-cDNA (Nukleotide 9 bis 1657, gemäß der cDNA in Fig. 2) über NotI in pA35N inseriert ("sense"-Konstrukt pA35N-Als bzw. "antisense"-Konstrukt pA35N-Alas). Die Expressionskassetten der "sense" bzw. "antisense"-Konstrukte wurden über die terminalen Schnittstellen (NcoI-Schnittstelle aufgefüllt, mit HindIII partial nachverdaut) als ca. 2410 Bp-Fragment isoliert und in die EcoRI- (aufgefüllt) und HindIII-Schnittstellen des binären Vektors pBin19 (Ref. 30) inseriert (= pBin-35-Als bzw. pBin-35-Alas). Durch Fusion mit der ebenfalls aufgefüllten NcoI-Schnittstelle des Fragments wird die EcoRI-Schnittstelle des Vektors regeneriert. Zusätzlich wurde

in einem Standard-PCR-Ansatz ("sense"-Primer: KS-Sequenzprimer (Stratagene), verlängert für PCR, 5'-GGC CCC CCC TCG AGG TCG ACG GTA TCG-3'; "antisense"-Primer: 5'-GGGCCTCTAGACTCGAG AGC (CT) AC TAC TCT TCC TTG CTG CTG GCT AAT CTT G-3', XbaI-Schnittstelle unterstrichen, XhoI-Schnittstelle kursiv) bei 50°C "annealing"-Temperatur ein 5'-Fragment der GntI-cDNA amplifiziert (Nukleotide 9 bis 261, gemäß der cDNA in Fig. 2 und SEQ ID NO: 1). Das PCR-Produkt wurde mit XbaI (im "antisense"-Primer) und NotI (im 5'-Linker der cDNA) verdaut, als ca. 260 Bp-Fragment isoliert und in pA35N kloniert (= pA35N-A1-kurz). Die Expressionskassette des kurzen "antisense"-Konstrukts wurde als EcoRI/HindIII-Fragment (ca. 1020 Bp) ebenfalls in pBin19 inseriert (= pBin-35-A1-kurz).

Bsp. 4: Transformation von Agrobakterien durch die binären GntI-Konstrukte und Regeneration von transgenen Kartoffel- bzw. Tabakpflanzen aus infizierten Blattscheiben. Die binären "antisense"-GntI-Konstrukte (pBin-35-Alas bzw. pBin-35-A1-kurz) wurden in den Agrobakterien-Stamm GV2260 transformiert (Ref. 34,35). Mit den rekombinanten Agrobakterienlinien wurden exemplarisch sterile Blattscheiben von Kartoffelpflanzen der Var. Désirée bzw. Tabakpflanzen der Var. Wisconsin 38 infiziert (50 μ l einer frischen Übernachtkultur in 10 ml flüssigem 2MS-Medium: $\underline{2}$ % Saccharose in $\underline{\underline{M}}$ urashige & $\underline{\underline{S}}$ koog Salz/Vitamin-Standard-Medium, pH 5,6; Blattstückchen ohne Mittelrippen; Cokultivierung 2 Tage dunkel in Pflanzen-Klimakammern). Nach Waschen der infizierten Blattstückchen in 2MS-Medium mit 250 μ g/ml Claforan wurden aus diesen in Gewebekultur unter Kanamycin-Selektion transgene Pflanzen regeneriert (Kartoffelprotokoll Ref. 26; Tabakprotokoll Ref. 36) und auf reduzierte GnTI-Aktivität getestet (exemplarisch in Fig. 5 für transgene Kartoffelpflanzen gezeigt). Wie aus Fig. 5 ersehen werden kann, war die "antisense"-Suppression komplexer Glykoprotein-Modifikation in der transgenen Kartoffelpflanze #439 erfolgreich. Die festgestellte Drosselung der komplexen Glykoprotein-Modifikation war in dieser Transformante über den gesamten Untersuchungszeitraum von mehreren Monaten stabil und wurde in drei, jeweils im Abstand von ca. 1 Monat durchgeführten Tests bestätigt. Analoge Ergebnisse wurden für die entsprechenden transgenen Tabakpflanzen erhalten.

Bsp. 5: Gewinnung von rekombinantem Kartoffel-GnTI-Protein (zur Antikörperproduktion).

Mit Hilfe des pET-Systems (Novagen) wurde rekombinante GnTI mit 10 zusätzlichen N-terminalen Histidin-Resten ("His-tag") in E. coli erzeugt und durch Metall-Chelat-Affinitätschromatografie gereinigt. Ein cDNA-Fragment, das die Nukleotide 275-1395 der Kartoffel GntI-cDNA umfaßt (entsp. As 75-446, Fig. 2 bzw. SEQ ID NO: 1 und 2), wurde mittels Standard-PCR ("annealing"-Temperatur 50°C, 30 Zyklen, Ref. 31) amplifiziert ("sense"-Primer GntI-5'fus: 5'-CATGGATCC CTC GAG AAG CGT CAG GAC CAG GAG TGC CGG C-3'; "antisense"-Primer GntI-3'stop: 5'-ATCCCGGGATCCG CTA CGT ATC TTC AAC TCC AAG TTG-3'; XhoI- bzw. BamHI Schnittstellen unterstrichen, Stop-Codon kursiv), und über die Restriktionsschnittstellen der synthetischen Primer (5'-XhoI-GntI-BamHI-3') in den Vektor pET16b (Novagen) inseriert (= pET-His-Al). Nach Vermehrung und Analyse in E. coli XL1-Blue (Stratagene) wurde das Konstrukt als Glycerinkultur archiviert. Zur Überexpression wurden kompetente E. coli BL21(DE3)pLysS-Zellen (Novagen) mit pET-His-Al transformiert. Zugabe von IPTG (Isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid, ad 0,5-2 mM) zu einer logarithmisch wachsenden BL21-Kultur induziert zunächst die Expression von (bakterienchromosomaler) T7-RNA-Polymerase und damit ebenfalls die Expression des rekombinanten Fusionsproteins, das in pET-Vektoren (Novagen) unter T7-Promotor-Kontrolle steht. Aus induzierten BL21:pET-His-A1-Zellen wurde rekombinante Kartoffel-GnTI mit "His-tag" unter denaturierenden Bedingungen (Hersteller-Protokoll, Novagen) mittels Metall-Chelat-Chromatographie an TALON-Matrix (Clontech) gereinigt und die Präparation mittels SDS-PAGE auf Einheitlichkeit überprüft.

. .

Bsp. 6: Erzeugung von polyklonalen Antikörpern in Kaninchen. Rekombinante Kartoffel-GnTI (aus Bsp. 5) wurde als Antigen verwendet. Nach Entnahme von einigen Millilitern Prä-Immunserum wurde den Kaninchen in dreiwöchigen Abständen 300-500 µg affinitätsgereinigtes Protein zusammen mit 25 μ g GMDP-Adjuvans (Gerbu) subcutan injiziert. Nach drei Basis-Injektionen wurden die Tiere 12 bis 14 Tage nach der jeweiligen Folge-Injektion ("Boost") aus der Ohrvene geblutet, das Serum gewonnen (Ref. 37) und auf Erkennung rekombinanter GnTI in "Western Blot"-Analysen (1:200 bis 1:2000-Verdünnung) getestet. Das Antiserum der "Boosts" mit geringstem Hintergrund-zu-Signal-Verhältnis wurde mit 0,04% Natriumazid versetzt, aliquotiert und bei +4°C bzw. längerfristig bei -20°C gelagert. Wie in Fig. 6 gezeigt, ergaben "Western Blot"-Analysen von Tabak-Kalluszellen (BY-2-Suspensionskultur) ein spezifisches GnTI-Signal in angereicherten Mikrosomenfraktionen, welches anzeigt, daß die gegen das rekombinante Protein hergestellten Antikörper pflanzliche GnTI spezifisch erkennen. Der Nachweis wurde mit angereicherten Mikrosomenfraktionen (ER und Golgi-Vesikel) durchgeführt, da GnTI-Protein, bedingt durch die geringen Mengen, in Pflanzen-Rohextrakten mit der verwendeten "Western-Blot"-Methode nicht nachzuweisen ist.

Referenzen

- R Kornfeld, S Kornfeld (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu Rev Biochem <u>54</u>: 631-664
- 2) GP Kaushal, T Szumilo, AD Elbein (1988). Structure and biosynthesis of plant N-linked glycans. In J Preiss (editor)
 The Biochemistry of Plants, Vol 14: Carbohydrates. Academic Press, San Diego, CA, pp 421-463
- 3) L Faye, MJ Chrispeels (1989) Apparent inhibition of β -fructosidase secretion by tunicamycin may be explained by breakdown of the unglycosylated protein during secretion. Plant Physiol 89: 845-851

- 4) TW Rademacher, RB Parekh, RA Dwek (1988) Glycobiology. Annu Rev Biochem <u>57</u>: 785-838
- 5) A Sturm (1991) Heterogeneity of the complex N-linked oligo-saccharides at specific glycosylation sites of 2 secreted carrot glycoproteins. Eur J Biochem 199: 169-179
- 6) K Olden, BA Bernard, MJ Humphries, T Yeo, SL White, SA Newton, HC Bower, JB Parent (1985) Function of glycoprotein glycans. Trends Biochem Sci 10: 78-82
- 7) P Stanley (1989) Chinese hamster ovary cell mutants with multiple glycosylation defects for production of glycoproteins with minimal carbohydrate heterogeneity. Mol Cell Biol 9: 377-383
- 8) R Kumar, J Yang, RD Larsen, P Stanley (1990) Cloning and expression of N-acetylglucosaminyltransferase I, the medial Golgi transferase that initiates complex N-linked carbohydrate formation. Proc Natl Acad Sci USA 87: 9948-9952
- 9) JW Dennis, S Laferte, C Waghorne, ML Breitman, RS Kerbel (1987) $\beta \rightarrow 6$ branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. Science 236: 582-585
- . 10) MN Fukuda (1990) HEMPAS disease: genetic defect of glycosylation. Glycobiology $\underline{1}$: 9-15
 - 11) MN Fukuda, KA Masri, A Dell, L Luzzatto, KW Moremen (1990) Incomplete synthesis of N-glycans in congenital dyserythropoetic anemia type II caused by a defect in the gene encoding α-mannosidase II. Proc Natl Acad Sci USA 87: 7443-7447
 - 12) M Laurière, C Laurière, MJ Chrispeels, KD Johnson, A Sturm (1989) Characterization of a xylose-specific antiserum that reacts with the complex asparagine-linked glycans of ex-

tracellular and vacuolar glycoproteins. Plant Physiol 90: 1182-1188

- 13) A von Schaewen, A Sturm, J O'Neill, MJ Chrispeels (1993)
 Isolation of a mutant Arabidopsis plant that lacks N-acetyl glucosaminyl transferase I and is unable to synthesize Golgi-modified complex N-linked glycans. Plant Physiol 102: 1109-1118
- 14) JK-C Ma, MB Hein (1995) Plant antibodies for immunotherapy. Plant Physiol 109: 341-346
- 15) AS Moffat (1995) Medical applications: Exploring transgenic plants as a new vaccine source. Science 268: 658-660 (Zusammenfassung von zwei Originalveröffentlichungen in derselben Ausgabe)
- 16) CB Taylor (1997) Comprehending cosuppression. Plant Cell 9: 1245-1249 (Zusammenfassung von mehreren Originalveröffent-lichungen in derselben Ausgabe)
- 17) M Faske, JE Backhausen, M Sendker, M Singer-Bayrle, R Scheibe, A von Schaewen (1997) Transgenic tobacco plants expressing pea chloroplast *Nmdh* cDNA in sense and antisense orientation: Effects on NADP-MDH level, stability of transformants, and plant growth. Plant Physiol 115: 705-715
- 18) R Koes, E Souer, A van Houwelingen, L Mur, C Spelt, F Quattrocchio, J Wing, B Oppedijk, S Ahmed, T Maes, T Gerats, P Hoogeveen, M Meesters, D Kloos, JNM Mol (1995) Targeted gene inactivation in petunia by PCR-based selection of transposon insertion mutants. Proc Acad Sci USA 92: 8149-8153
- 19) EC McKinney, N Ali, A Traut, KA Feldmann, DA Belostotsky, JM McDowell, RB Meagher (1995) Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in Arabidopsis: actin mutants act2-1 and act4-1. Plant J 8: 613-622

- 20) F Altmann, G Kornfeld, T Dalik, E Staudacher, J Glössl (1993) Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells. N-acetylglucosaminyl transferase I and II activities in cultured lepidopteran cells. Glycobiology 3: 619-625
- 21) A Sturm, KD Johnson, T Szumilo, AD Elbein, MJ Chrispeels (1987) Subcellular localization of glycosidases and glycosyltransferases involved in the processing of N-linked oligosaccharides. Plant Physiol 85: 741-745
- 22) GM Church, W Gilbert (1984) Genomic sequencing. Proc Acad Sci USA 81: 1991-1995
- 23) J Sambrook, EF Fritsch, T Maniatis (1989) Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edn), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- 24) H Puchta, B Hohn (1996) From centiMorgans to base pairs: homologous recombination in plants. Plant Sci $\underline{1}$: 340-348
- 25) NW Barton, FS Furbish, GJ Murray, M Garfield, RO Brady (1990) Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in a patient with Gaucher disease. Proc Natl Acad Sci USA 87: 1913-1916
- 26) M Rocha-Sosa, U Sonnewald, W-B Frommer, M Stratmann, J Schell, L Willmitzer (1989) Both developmental and meta-bolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. EMBO J 8: 23-29
- 27) T Hildmann, M Ebneth, H Pena-Cortes, JJ Sanchez-Serrano, L Willmitzer, S Prat (1992) General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. Plant Cell 4: 1157-1170

- 28) KD Johnson, MJ Chrispeels (1987) Substrate specificities of N-acetylglucosaminyl-, fucosyl-, and xylosyltransferases that modify glycoproteins in the Golgi apparatus of bean cotyledons. Plant Physiol 84: 1301-1308
- 29) H Höfte, L Faye, C Dickinson, EM Herman, MJ Chrispeels (1991) The protein-body proteins phytohemagglutinin and to-noplast intrinsic protein are targeted to vacuoles in leaves of transgenic tobacco. Planta 184: 431-437
- 30) M Bevan (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. Nucl Acids Res 12: 8711-8721
- 31) K Graeve, A von Schaewen, R Scheibe (1994) Purification, characterization and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (Solanum tuberosum L.). Plant J 5: 353-361
- 32) B Damm, R Schmidt, L Willmitzer (1989) Efficient transformation of Arabidopsis thaliana using direct gene transfer to protoplasts. Mol Gen Genet 213: 15-20
- 33) A von Schaewen, M Stitt, R Schmidt, L Willmitzer (1990) Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and Arabidopsis plants leads to accumulation of carbohydrate, inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. EMBO J. 9: 3033-3044

- 34) R Deblaere, B Bytebier, H De Greve, F Debroeck, J Schell, M van Montagu, J Leemans (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium mediated gene transfer to plants. Nucl Acids Res 13: 4777-4788
- 35) R Höfgen, L Willmitzer (1988) Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. Nucl Acids Res $\underline{16}$: 9877

- 36) T Voelker, A Sturm, MJ Chrispeels (1987) Differences in expression between two seed lectin alleles obtained from normal and lectin-deficient beans are maintained in transgenic tobacco. EMBO J 6: 3571-3577
- 37) E Harlow, D Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- 38) J Sorge, C West, B Westwood, E Beutler (1985) Molecular cloning and nucleotide sequence of human cerebrosidase cDNA. Proc Natl Acad Sci USA 82: 7289-7293
- 39) TGM Schmidt, A Skerra (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. Prot Engineering 6: 109-122
- 40) W van der Wilden, NR Gilkes, MJ Chrispeels (1980) The endoplasmic reticulum of mung bean cotyledons: role in the accumulation of hydrolases in protein bodies during seedling growth. Plant Physiol. 66: 390-394

Patentansprüche

- 1. Verfahren zur Erzeugung von Glykoproteinen mit minimalen, einheitlichen und definierten Zuckerresten, umfassend das Züchten einer transgenen Pflanze, von Teilen transgener Pflanzen oder von transformierten Pflanzenzellen und das Isolieren des gesuchten Glykoproteins aus dem gezüchteten Material dadurch gekennzeichnet, daß die transgene Pflanze, die Teile transgener Pflanzen bzw. die transformierten Pflanzenzellen mit einem "antisense"-Konstrukt oder einem "sense"-Konstrukt, umfassend eine "antisense"-DNA bzw. "sense"-DNA bezüglich der DNA-Sequenz eines Gens oder einer cDNA für pflanzliche N-Acetylglucosaminyltransferase I oder eines Teils davon, zur Beseitigung oder Verringerung der N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität in diesen transformiert ist bzw. sind, wobei das "antisense"- oder "sense"-Konstrukt gegebenenfalls zusätzlich regulatorische Sequenzen für die Transkription der entsprechenden "antisense"- oder "sense"-DNA enthält.
 - 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für die Transformation ein "antisense"- oder "sense"-Konstrukt bezüglich einer der cDNAs, die N-Acetylglucosaminyltransferase I aus Solanum tuberosum, Nicotiana tabacum oder Arabidopsis thaliana kodieren, verwendet wird.
 - 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß für die Transformation ein "antisense"- oder "sense"-Konstrukt bezüglich einer der in den SEQ. ID. NO. 1, 3 oder 5 angegebenen DNA-Sequenzen verwendet wird.
 - 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die eingesetzte transgene Pflanze zusätzlich mit dem das gesuchte Glykoprotein kodierenden Gen transformiert worden ist.

- 5. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie N-Acetylglucosaminyl-transferase I aus *Solanum tuberosum* kodiert.
- 6. DNA nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ. ID. NO. 1 angegebene Nukleotidsequenz oder einen Teil davon umfaßt.
- 7. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie N-Acetylglucosaminyltransferase I aus Nicotiana tabacum kodiert.
- 8. DNA nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ. ID. NO. 3 angegebene Nukleotidsequenz oder einen Teil davon umfaßt.
- 9. DNA, die N-Acetylglucosaminyltransferase I aus Arabidopsis thaliana kodiert, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA die in SEQ. ID. NO. 6 angegebene Aminosäuresequenz kodiert oder die in SEQ. ID. NO. 5 angegebene Nukleotidsequenz oder einen Teil davon umfaßt.
- 10. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie die komplementäre Nukleotidsequenz zu der DNA nach Anspruch 6, 8 oder 9 aufweist.
- 11. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Substitution, Deletion und/oder Insertion einzelner oder mehrerer Nukleotide und/oder Verkürzung am 5'- und/oder 3'-Ende einer der DNAs nach einem der Ansprüche 5 bis 10 erhalten werden kann mit der Maßgabe, daß die DNA unter stringenten Bedingungen zumindest in einem Teilabschnitt mit der Ausgangs-DNA oder deren komplementärer Sequenz oder mit Teilen derselben hybridisiert.
- 12. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Gen darstellt oder Teil eines Gens ist, das das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I kodiert, und über ihre gesamte Länge hinweg oder in einem Teilabschnitt
- mit einer der DNA-Sequenzen oder -Fragmente nach einem der Ansprüche 5 bis 11 und/oder

mit einer DNA-Sequenz, die von den in den SEQ ID NO: 1, 3 und/oder 5 angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes abgeleitet worden ist,

unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

- 13. DNA-Konstrukt,
- dadurch gekennzeichnet, daß es eine oder mehrere der DNAs gemäß einem der Ansprüche 5 bis 14 umfaßt.
- 14. DNA-Konstrukt nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es eine "antisense"- oder "sense"- DNA bezüglich der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 5 bis 12 und ggf. regulatorische Sequenzen für die Transkription der "antisense"- bzw. "sense"-DNA umfaßt.
- 15. Vektor, Plasmid, Cosmid, Viren- oder Phagengenom, dadurch gekennzeichnet, daß er oder es zumindest eine DNA und/oder ein Konstrukt nach einem der Ansprüche 5 bis 14 umfaßt.
- 16. N-Acetylglucosaminyltransferase I aus Solanum tuberosum.
- 17. N-Acetylglucosaminyltransferase I aus Nicotiana tabacum.
- 18. N-Acetylglucosaminyltransferase I aus Arabidopsis thaliana, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die in SEQ ID NO: 6 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt.
- 19. N-Acetylglucosaminyltransferase I, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die in SEQ ID NO: 2 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt.
- 20. N-Acetylglucosaminyltransferase I, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die Aminosäuren 74 bis 446 der in SEQ ID NO: 2 angegebenen Aminosäuresequenz umfaßt.

- 21. N-Acetylglucosaminyltransferase I, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die in SEQ ID NO: 4 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt.
- 22. N-Acetylglucosaminyltransferase I, zugänglich aufgrund der Hybridisierung ihres Gen oder eines oder mehrerer Abschnitte ihres Gens mit einer oder mehreren der DNAs und/oder DNA-Fragmente gemäß einem der Ansprüche 5 bis 12.
- 23. Von den Enzymen gemäß einem der Ansprüche 16 bis 22 durch Substitution, Deletion, Insertion und/oder Modifikation einzelner Aminosäuren und/oder kleinerer Gruppen von Aminosäuren und/oder durch N- und/oder C-terminale Verkürzung und/oder Verlängerung abgeleitete Enzyme oder Proteine.
- 24. Protein oder Peptid, umfassend einen oder mehrere Abschnitte der Aminosäuresequenz(en) eines oder mehrerer der in einem der Ansprüche 16 bis 23 definierten Enzyme.
- 25. Protein oder Peptid, welches durch eine der DNAs nach einem der Ansprüche 5 bis 12 kodiert wird.
- 26. Antigen, dadurch gekennzeichnet, daß es
- die in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 angegebene Aminosäuresequenz oder
- die Aminosäuren 74 bis 446 der in Fig. 2 angegebenen Aminosäuresequenz oder
- eine durch Substitution, Deletion, Insertion und/oder Modifikation einzelner Aminosäuren und/oder kleinerer Gruppen von Aminosäuren von den in SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 angegebenen Aminosäuresequenzen abgeleitete Aminosäuresequenz oder
- einen Teil oder mehrere Teile dieser Sequenzen umfaßt mit der Maßgabe, daß das Antigen bei Immunisierung eines Wirtes mit diesem zur Bildung einer immunologischen Reaktion einschließlich der Erzeugung von gegen das Antigen gerichteten Antikörpern führt.

27. Monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er spezifisch eines oder mehrere der Enzyme oder Antigene nach einem der Ansprüche 16 bis 26 erkennt und dieses oder diese bindet.

28. Mikroorganismus,

dadurch gekennzeichnet, daß er durch mindestens eine der Nukleotidsequenzen, ausgewählt aus den DNAs, Konstrukten, Vektoren, Plasmiden, Cosmiden, Viren- oder Phagengenomen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 5 bis 15 transformiert ist.

- 29. Transgene Pflanze, transgener Samen, transgenes Vermehrungsmaterial, Teile transgener Pflanzen oder transformierte Pflanzenzelle, erhältlich durch Integration einer oder mehrerer DNA-Sequenz(en) oder Konstrukt(e) nach einem der Ansprüche 5 bis 13 unter Kontrolle eines in Pflanzen wirksamen Promotors in das Genom einer Pflanze oder durch Infektion durch ein eine oder mehrere DNA-Sequenz(en) oder Konstrukt(e) nach einem der Ansprüche 5 bis 13 enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Expression der DNA-Sequenz(en) oder des Konstrukts/der Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe.
- 30. Transgene Pflanze, transgener Samen, transgenes Vermehrungsmaterial, Teile transgener Pflanzen oder transformierte Pflanzenzelle mit fehlender oder verminderter N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität, erhältlich durch Integration eines oder mehrerer "antisense"- oder "sense"-Konstrukt(e) nach Anspruch 14 unter Kontrolle eines in Pflanzen wirksamen Promotors in das Genom einer Pflanze oder durch virale Infektion durch ein ein oder mehrere "antisense"- bzw. "sense"-Konstrukt(e) nach Anspruch 14 enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Transkription von dem oder den "antisense"-Konstrukt(en) oder von dem oder den "sense"-Konstrukt(en) in infiziertem Pflanzengewebe.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Erfindung betrifft pflanzliche *GntI*-Sequenzen, insbesondere pflanzliche Nukleinsäuresequenzen, die das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI) kodieren, davon abgeleitete DNA-Sequenzen einschließlich *GntI*-"antisense"- und "sense"-Konstrukten, und deren Translationsprodukte, gegen diese Translationsprodukte gerichtete Antikörper sowie die Verwendung der Sequenzinformation zur Gewinnung von transformierten Mikroorganismen und von transgenen Pflanzen, einschließlich solchen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität. Derartige Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-lung von Glykoproteinen spezifischer Konstitution bezüglich der Zuckerreste von großer Bedeutung.

1c836 U.S. PTO 09/591466 08/09/00

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER:
 - (A) NAME: von Schaewen, Antje, Dr. rer. nat.
 - (B) STRASSE: Natruperstrasse 169a
 - (C) ORT: Osnabrück
 - (E) LAND: Deutschland
 - (F) POSTLEITZAHL: 49076
 - (G) TELEFON: 0541-684029
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Herstellung von Glykoproteinen in Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI)-Aktivitaet unter Verwendung pflanzlicher gntI-Sequenzen
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6
 - (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
 - (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:
 - (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1669 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 - (iv) ANTISENSE: NEIN
 - (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Solanum tuberosum
 - (B) STAMM: Desiree
 - (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: "sink" Organ
 - (F) GEWEBETYP: Mesophyll
 - (G) ZELLTYP: Blattzellen
 - (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
 - (A) BIBLIOTHEK: Lambda ZAP II (EcoRI)
 - (B) CLON(E): gntI-A1(K)
 - (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLUSSEL: misc_feature

```
(B) LAGE: 659..667
     (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "Asn-Codon ist eine
            potentielle Glykosylierungsstelle"
             /product= "Konsensus Sequenz fuer
            N-Glykosylierung"
             /phenotype= "N-Glykane modulieren
             Proteineigenschaften"
             /standard_name= "N-Glykosylierungsstelle"
             /label= pot-CHO
             /note= "fehlt in tierischen GnTI-Sequenzen"
(ix) MERKMAL:
      (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
      (B) LAGE: 53..1393
      (C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell
      (D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 53
             /function= "initiiert komplexe N-Glykane auf
             sekret. Glykoproteinen"
             /EC number= 2.4.1.101
             /product=
             "beta-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase I"
             /evidence= EXPERIMENTAL
             /gene= "cgl"
             /standard name= "gntI"
             /label= ORF
             /note= "erste gntI-Sequenz aus Kartoffel
                      (unpubliziert)"
(ix) MERKMAL:
       (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
       (B) LAGE: 15..52
(ix) MERKMAL:
       (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
       (B) LAGE: 1394..1655
 (ix) MERKMAL:
       (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
       (B) LAGE:80..139
       (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "Membrananker
              (Aminosäuren 10-29)"
              /product= "hydrophober Aminosäurebereich in
                     GnTI"
              /standard name= "Membrananker eines Typ II
              Golgi-Proteins"
              /note= "durch Vergleich mit tierischen GnTI-
                  Sequenzen identifiziert"
 (ix) MERKMAL:
       (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
       (B) LAGE:1..14
       (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "zur Herstellung der
              cDNA-Bank in Lambda ZAP II"
              /product= "EcoRI/NotI-cDNA-Adaptor"
              /number= 1
```

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE:1656..1669
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "EcoRI/NotI-Adaptor" /number= 2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAATT	CGC	GG C	CGCC	TGAG.	A AA	CCCT	CGAA	TTC.	AATT	TCG	CATT	TGGC	AG A	Me	G t 1	55
AGA G Arg G	sgg . Sly	AAC . Asn	AAG Lys 5	TTT Phe	TGC Cys	TTT Phe	GAT Asp	TTA Leu 10	CGG Arg	TAC Tyr	CTT Leu	CTC Leu	GTC Val 15	GTG Val	GCT Ala	103
GCT (CTC Leu	GCC Ala 20	TTC Phe	ATC Ile	TAC Tyr	ATA Ile	CAG Gln 25	ATG Met	CGG Arg	CTT Leu	TTC Phe	GCG Ala 30	ACA Thr	CAG Gln	TCA Ser	151
GAA :	TAT Tyr 35	GTA Val	GAC Asp	CGC Arg	CTT Leu	GCT Ala 40	GCT Ala	GCA Ala	ATT Ile	GAA Glu	GCA Ala 45	GAA Glu	AAT Asn	CAT His	TGT Cys	199
ACA I	AGT Ser	CAG Gln	ACC Thr	AGA Arg	TTG Leu 55	CTT Leu	ATT Ile	GAC Asp	AAG Lys	ATT Ile 60	AGC Ser	CAG Gln	CAG Gln	CAA Gln	GGA Gly 65	247
AGA Arg	GTA Val	GTA Val	GCT Ala	CTT Leu 70	GAA Glu	GAA Glu	CAA Gln	ATG Met	AAG Lys 75	CAT His	CAG Gln	GAC Asp	CAG Gln	GAG Glu 80	TGC Cys	295
CGG Arg	CAA Gln	TTA Leu	AGG Arg 85	GCT Ala	CTT Leu	GTT Val	CAG Gln	GAT Asp 90	CTT Leu	GAA Glu	AGT Ser	AAG Lys	GGC Gly 95	ATA Ile	AAA Lys	343
AAG Lys	TTA Leu	ATC Ile 100	Gly	GAT Asp	GTG Val	CAG Gln	ATG Met 105	Pro	GTG Val	GCA Ala	GCT Ala	GTA Val 110	GTT Val	GTT Val	ATG Met	391
GCT Ala	TGC Cys 115	Ser	CGT Arg	ACT Thr	GAC Asp	TAC Tyr 120	Leu	GAG Glu	AGG Arg	ACT Thr	ATT Ile 125	Lys	TCC Ser	ATC Ile	TTA Leu	439
AAA Lys 130	TAC Tyr	CAA Gln	ACA Thr	TCT Ser	GTT Val 135	Ala	TCA Ser	AAA Lys	TAT Tyr	CCT Pro 140	Leu	TTC Phe	ATA Ile	TCC Ser	CAG Gln 145	487
GAT Asp	GGA Gly	TCA Ser	AA1 Asr	CCT Pro 150	Asp	GTA Val	AGA Arg	AAG J Lys	CTT Lev 155	ı Ala	TTC	AGC Ser	TAT Tyr	GGT Gly 160	CAG Gln	535
CTG Leu	ACG Thr	TAT	ATO Met	Glr	CAC His	TTG Leu	GAT Asp	TAT Tyr 170	Gli	A CCT	GTC Val	G CAT L His	ACT Thr 175	GIU	AGA Arg	583
CCA Pro	GG G	GAA Glu 180	Le	GTT u Val	GCA Ala	A TAC	TAC Ty:	r Lys	S ATT	r GCA e Ala	A CG	r CAT g His 190	тул	AAG Lys	TGG Trp	631
GCA Ala	TT(Lev 195	Asp د	CAG Gl:	G CT(TT:	CAC His	Ly:	G CAT	AA 7 teA e	r TT:	r AGG e Se: 20	r Ar	r GTT g Val	T ATO	C ATA	679

CTA Leu 210	GAA Glu	GAT Asp	GAT Asp	ATG Met	GAA Glu 215	ATT Ile	GCT Ala	GCT Ala	Asp	TTT Phe 220	TTT Phe	GAC Asp	TAT Tyr	rne	GAG Glu 225	727
GCT Ala	GGA Gly	GCT Ala	ACT Thr	CTT Leu 230	CTT Leu	GAC Asp	AGA Arg	GAC Asp	AAG Lys 235	TCG Ser	ATT Ile	ATG Met	ATa	ATT Ile 240	TCT Ser	775
TCT Ser	TGG Trp	AAT Asn	GAC Asp 245	AAT Asn	GGA Gly	CAA Gln	AGG Arg	CAG Gln 250	TTC Phe	GTC Val	CAA Gln	GAT Asp	CCT Pro 255	GAT Asp	GCT Ala	823
CTT Leu	TAC Tyr	CGC Arg 260	TCA Ser	GAC Asp	TTT Phe	TTT Phe	CCT Pro 265	GGT Gly	CTT Leu	GGA Gly	TGG Trp	ATG Met 270	CTT Leu	TCA Ser	AAA Lys	871
TCA Ser	ACT Thr 275	TGG Trp	TCC Ser	GAA Glu	CTA Leu	TCT Ser 280	CCA Pro	AAG Lys	TGG Trp	CCA Pro	AAG Lys 285	GCT Ala	TAC Tyr	TGG Trp	GAT Asp	919
GAC Asp 290	TGG Trp	CTA Leu	AGG Arg	CTG Leu	AAA Lys 295	GAA Glu	AAT Asn	CAC His	AGA Arg	GGT Gly 300	CGA Arg	CAA Gln	TTT	ATT Ile	CGC Arg 305	967
CCA Pro	GAA Glu	GTT Val	TGC Cys	AGA Arg		TAC Tyr	AAT Asn	TTT Phe	GGT Gly 315	GIU	CAT His	GGT Gly	TCT Ser	AGT Ser 320	neu	1015
GGG Gly	CAG Gln	TTT Phe	TTT Phe 325	Lys	CAG Gln	TAT	CTT Leu	GAG Glu 330	ı Pro	ATT Ile	AAG Lys	CTA Leu	AAT Asn 335	Ash	GTC Val	1063
CAG Gln	GTI Val	GAT Asp 340	Trp	AAC Lys	TCA S Ser	ATG Met	GAC Asp 345	Leu	A AGT 1 Ser	TAC Tyr	CTI Lev	TT0 Leu 350	ı GIU	GAC Asp	AAC Asn	1111
TAI Tyr	GTC Val	Ly	A CAG	TT:	r GG(GAC Asp 360) Le	G GTT 1 Val	r AAA l Lys	A AAG S Lys	G GC: 36!	я г.	G CCC	ATC Ile	CAC His	1159
GG# Gl ₃ 370	, Ala	r GA' a As	r GC p Ala	r GT' a Va	T TT(1 Let 37!	ı Lys	A GC/	A TT	T AA(e Ası	TATA TILE 380	a As	r GG	r GAT y Asp	GT(G CGT L Arg 385	1207
AT:	r CA	G TA n Ty	C AG r Ar	A GA g As 39	p Gl	A CTI	A GA	C TT' p Ph	T GAN e Gl	u Asj	TAT p Il	c GC' e Al	T CG/ a Arq	A CAG g Gl: 40	S TTT n Phe O	1255
GG Gl	C AT y Il	T TT e Ph	T GA e Gl 40	u Gl	A TG u Tr	G AA	G GÁ s As	T GG p Gl 41	y Va	A CC	A CG o Ar	G GC g Al	A GC a Al 41	а ту	T AAA r Lys	1303
GG Gl	G AT y Il	A GT e Va 42	l Va	T TI 1 Ph	c cg e Ar	G TT g Ph	T CA e Gl 42	n Th	A TC ir Se	T AG r Ar	A CG g Ar	T GT g Va 43	1 Pn	C CT e Le	T GTT u Val	1351
TC Se	C CC r Pr 43	o As	T TC	T CT	rT CG eu Ar	A CA g Gl 44	n Le	T GG u Gl	GA GT .y Va	T GA 1 Gl	A GA u As	sp Tr	T TA	.G		1393
CG	AAGA	TAT	ATI	GGA	SCCT	GAGC	AACA	TA.	rtaga	CTTA	T T	rggt <i>i</i>	AGGAT	ACA	TTTGAAA	1453
G.P	GCT	SACA	C GAA	\AAG	TATG	ACTA	CCAC	TA (CTAC	CATGO	A AC	CATT	LAAT 1	GTI	AATGGAA	1513
GG	SAACO	CAC	r GC	TAT	rgtt	GGA	TGG#	ATG A	AATC#	ATCAC	CC A	CATC	TATI	TAT	CAAGTTT	1573

АСАААСАТАА	AGAGGAAATG	TTGCCCTATA	AAAACAAATT	TTTTGTTTCT	AAGAAGGAAC	1633
GTTACGATTA	TGAGCAACTT	TGGCGGCCGC	GAATTC			1669
•						

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 447 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Arg Gly Asn Lys Phe Cys Phe Asp Leu Arg Tyr Leu Leu Val Val 1 5 10 15

Ala Ala Leu Ala Phe Ile Tyr Ile Gln Met Arg Leu Phe Ala Thr Gln 20 25 30

Ser Glu Tyr Val Asp Arg Leu Ala Ala Ala Ile Glu Ala Glu Asn His 35 40 45

Cys Thr Ser Gln Thr Arg Leu Leu Ile Asp Lys Ile Ser Gln Gln Gln 50 55 60

Gly Arg Val Val Ala Leu Glu Glu Gln Met Lys His Gln Asp Gln Glu 65 70 75 80

Cys Arg Gln Leu Arg Ala Leu Val Gln Asp Leu Glu Ser Lys Gly Ile 85 90 95

Lys Lys Leu Ile Gly Asp Val Gln Met Pro Val Ala Ala Val Val 100 105 110

Met Ala Cys Ser Arg Thr Asp Tyr Leu Glu Arg Thr Ile Lys Ser Ile 115 120 125

Leu Lys Tyr Gln Thr Ser Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe Ile Ser 130 135 140

Gln Asp Gly Ser Asn Pro Asp Val Arg Lys Leu Ala Leu Ser Tyr Gly 145 150 155 160

Gln Leu Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Tyr Glu Pro Val His Thr Glu 165 170 175

Arg Pro Gly Glu Leu Val Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His Tyr Lys . 180 185 190

Trp Ala Leu Asp Gln Leu Phe His Lys His Asn Phe Ser Arg Val Ile 195 200 205

Ile Leu Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Ala Asp Phe Phe Asp Tyr Phe 210 215 220

Glu Ala Gly Ala Thr Leu Leu Asp Arg Asp Lys Ser Ile Met Ala Ile 225 230 235 240

Ser Ser Trp Asn Asp Asn Gly Gln Arg Gln Phe Val Gln Asp Pro Asp 245 250 255 Ala Leu Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met Leu Ser 260 265 270

Lys Ser Thr Trp Ser Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala Tyr Trp 275 280 285

Asp Asp Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Arg Gly Arg Gln Phe Ile

Arg Pro Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly Ser Ser 305 310 315

Leu Gly Gln Phe Phe Lys Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu Asn Asp 325 330 335

Val Gln Val Asp Trp Lys Ser Met Asp Leu Ser Tyr Leu Leu Glu Asp 340 345 350

Asn Tyr Val Lys His Phe Gly Asp Leu Val Lys Lys Ala Lys Pro Ile 355 360 365

His Gly Ala Asp Ala Val Leu Lys Ala Phe Asn Ile Asp Gly Asp Val 370 375 380

Arg Ile Gln Tyr Arg Asp Gln Leu Asp Phe Glu Asp Ile Ala Arg Gln 385 390 395

Phe Gly Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Ala Ala Tyr 405 410 415

Lys Gly Ile Val Val Phe Arg Phe Gln Thr Ser Arg Arg Val Phe Leu 420 425 430

Val Ser Pro Asp Ser Leu Arg Gln Leu Gly Val Glu Asp Thr 4 435 440 445

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1737 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 - (iv) ANTISENSE: NEIN
 - (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Nicotiana tabacum
 - (B) STAMM: Samsun NN
 - (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: "sink" Organ
 - (F) GEWEBETYP: Mesophyll
 - (G) ZELLTYP: Blattzellen
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
 - (A) BIBLIOTHEK: Lambda ZAP II (EcoRI)
 - (B) CLON(E): gntI-A9(T)

```
(ix) MERKMAL:
```

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 733..741
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "Asn-Codon ist eine potentielle Glykosylierungsstelle" /product= "Konsensus Sequenz für N-Glykosylierung" /phenotype= "N-Glykane modulieren Proteineigenschaften" /standard_name= "N-Glykosylierungsstelle" /label= pot-CHO /note= "fehlt in tierischen GnTI-Sequenzen"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLUSSEL: CDS
- (B) LAGE: 127..1467
- (C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell

(D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 127
/function= "initiiert komplexe N-Glykane auf sekret. Glykoproteinen" /EC_number= 2.4.1.101

/product=

"beta-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase I" /evidence= EXPERIMENTAL

/gene= "cgl"

/standard name= "gntI"

/label= ORF

/note= "erste gntI-Sequenz aus Tabak (unpubliziert)"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 15..126

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
- (B) LAGE:1468..1723

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:154..213
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "Membrananker (Aminosäuren 10-29)" /product= "hydrophober Aminosaurebereich in GnTI"

/standard_name= "Membrananker eines Typ II Golgi-Proteins"

/note= "durch Vergleich mit tierischen GnTI-Sequenzen identifiziert"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc feature
- (B) LAGE:1..14
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "zur Herstellung der cDNA-Bank in Lambda ZAP II" /product= "EcoRI/NotI-cDNA-Adaptor" /number= 1

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLUSSEL: misc_feature
 (B) LAGE:1724..1737
 (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "EcoRI/NotI-Adaptor" /number= 2

(xi)	SEQUENZBESCHREIBUNG:	SEQ	ΙD	NO:	3:
------	----------------------	-----	----	-----	----

GAATTCGCGG C	CGCCATTGA CT	GATCCTA ACT	GAACAGG CAAA	TAAAT CCAGCG	ATGA 60
AACACTCATA A	CTGAACACT GA	SAGACTAT TCG	CTTTCTC CTAA	AGCCTT CAATCG	AATT 120
CGCACG ATG A Met A	GA GGG AAC A rg Gly Asn L 450	ys Phe Cys C	GT GAT TTC CO ys Asp Phe A: 55	GG TAC CTC CT rg Tyr Leu Le 460	rc 168 eu
ATC TTG GCT Ile Leu Ala	GCT GTC GCC Ala Val Ala 465	TTC ATC TAC . Phe Ile Tyr 470	ACA CAG ATG O	CGG CTT TTT G Arg Leu Phe <i>P</i> 475	GCG 216 Ala
ACA CAG TCA Thr Gln Ser 480	GAA TAT GCA Glu Tyr Ala	GAT CGC CTT Asp Arg Leu 485	Ala Ala Ala	ATT GAA GCA (Ile Glu Ala (490	SAA 264 Slu
AAT CAT TGT Asn His Cys 495	ACA AGC CAG Thr Ser Gln	ACC AGA TTG Thr Arg Leu 500	CTT ATT GAC Leu Ile Asp 505	CAG ATT AGC G	CTG 312 Leu
CAG CAA GGA Gln Gln Gly 510	AGA ATA GTT Arg Ile Val 515	GCT CTT GAA Ala Leu Glu	GAA CAA ATG Glu Gln Met 520	Lys Arg Gin .	GAC 360 Asp 525
CAG GAG TGC Gln Glu Cys	CGA CAA TTA Arg Gln Leu 530	AGG GCT CTT Arg Ala Leu	GTT CAG GAT Val Gln Asp 535	CTT GAA AGT Leu Glu Ser 540	AAG 408 Lys
GGC ATA AAA Gly Ile Lys	AAG TTG ATC Lys Leu Ile 545	GGA AAT GTA Gly Asn Val 550	CAG ATG CCA Gln Met Pro	GTG GCT GCT Val Ala Ala 555	GTA 456 Val
GTT GTT ATG Val Val Met 560	GCT TGC AAT Ala Cys Asn	CGG GCT GAT Arg Ala Asp 565	TAC CTG GAA Tyr Leu Glu	AAG ACT ATT Lys Thr Ile 570	AAA 504 Lys
TCC ATC TTA Ser Ile Leu 575	AAA TAC CAA Lys Tyr Gln	ATA TCT GTT Ile Ser Val 580	GCG TCA AAA Ala Ser Lys 585	TAT CCT CTT Tyr Pro Leu	TTC 552 Phe
ATA TCC CAG Ile Ser Gln 590	GAT GGA TCA Asp Gly Ser 595	His Pro Asp	GTC AGG AAG Val Arg Lys 600	CTT GCT TTG Leu Ala Leu	AGC 600 Ser 605
TAT GAT CAG Tyr Asp Glr	G CTG ACG TAT Leu Thr Tyr 610	ATG CAG CAC Met Gln His	TTG GAT TTT Leu Asp Phe 615	GAA CCT GTG Glu Pro Val 620	CAT 648 His
ACT GAA AGA Thr Glu Arg	A CCA GGG GAG G Pro Gly Glu 625	CTG ATT GCA Leu Ile Ala 630	. Tyr Tyr Lys	ATT GCA CGT Ile Ala Arg 635	CAT 696 His

TAC Tyr	AAG Lys	TGG Trp 640	GCA Ala	TTG Leu	GAT Asp	Gln	CTG Leu 645	TTT Phe	TAC Tyr	AAG (Lys)	CAT	AAT Asn 650	TTT Phe	AGC Ser	CGT Arg	744
GTT Val	ATC Ile 655	ATA Ile	CTA Leu	GAA Glu	GAT Asp	GAT Asp 660	ATG Met	GAA Glu	ATT Ile	GCC Ala	CCT Pro 665	GAT Asp	TTT Phe	TTT Phe	GAC Asp	792
TTT Phe 670	TTT Phe	GAG Glu	GCT Ala	GGA Gly	GCT Ala 675	ACT Thr	CTT Leu	CTT Leu	GAC Asp	AGA Arg 680	GAC Asp	AAG Lys	TCG Ser	ATT Ile	ATG Met 685	840
GCT Ala	ATT Ile	TCT Ser	TCT Ser	TGG Trp 690	AAT Asn	GAC Asp	TAA Asn	GGA Gly	CAA Gln 695	ATG Met	CAG Gln	TTT Phe	GTC Val	CAA Gln 700	GAT Asp	888
CCT Pro	TAT Tyr	GCT Ala	CTT Leu 705	TAC Tyr	CGC Arg	TCA Ser	GAT Asp	TTT Phe 710	TTT Phe	CCC Pro	GGT Gly	CTT Leu	GGA Gly 715	TGG Trp	ATG Met	936
CTŤ Leu	TCA Ser	AAA Lys 720	Ser	ACT Thr	TGG Trp	GAC Asp	GAA Glu 725	TTA Leu	TCT Ser	CCA Pro	AAG Lys	TGG Trp 730	PIO	AAG Lys	GCT Ala	984
TAC Tyr	TGG Trp	Asp	GAC Asp	TGG Trp	CTA Leu	AGA Arg 740	Leu	AAA Lys	GAG Glu	AAT Asn	CAC His 745	Arg	GGT Gly	CGA Arg	CAA Gln	1032
TTT Phe 750	: Ile	CGC Arg	CCA Pro	GAA Glu	GTT Val 755	Cys	AGA Arg	ACA Thr	TAT Tyr	AAT Asn 760	TTT Phe	GGT Gly	GAG	CAT His	GGT Gly 765	1080
TCT Sei	AGT Sei	TT(GGG Gly	G CAG	n Phe	TTC Phe	AAG Lys	CAG Gln	TAT Tyr 775	Leu	GAG Glu	CCA Pro	ATT	780	A CTA Leu	1128
AA Ası	r GA: n Asj	r GTO	C CAC 1 Glr 78	n Val	F GAT L Asp	TGG Trp	AAG Lys	TCA S Ser 790	Met	GAC Asp	CTI Lev	r AGT ı Sei	TAC Tyr 795	_ ье	r TTG i Leu	1176
GA:	G GA u As	C AA p As 80	n Ty	C GT(r Va	G AAA l Lys	A CAC	TT1 S Phe 80	e Gly	r GAG Y Asi	C TTG p Leu	GT:	r AAZ l Ly: 81	s гуз	G GC' s Al	r AAG a Lys	1224
CC Pr	C AT o Il 81	e Hi	T GG s Gl	A GC' y Ala	T GA:	F GCT Ala 820	a Va.	C TTO	G AA	A GCA s Ala	TT's Ph	e As	C ATA	A GA e As	T GGT p Gly	1272
GA As 83	p Va	G CG l Ar	T AT	T CA e Gl	G TA n Ty 83	r Ar	A GA	T CA	A CT. n Le	A GAC u Asp 840	o Ph	T GA e Gl	A AA' u As:	T AT n Il	C GCA e Ala 845	.
CG Ar	G CA	A TI n Ph	T GG e Gl	C AT y Il 85	e Ph	T GA e Gl	A GA u Gl	A TG u Tr	G AA p Ly 85	s As	r GG o Gl	T GT y Va	A CC 1 Pr	A CG o Ar 86	T GCA g Ala 0	A 1368
GC Al	A TA a Ty	T AF	AA GG /s Gl 86	y Il	A GT e Va	A GT l Va	T TT l Ph	C CG e Ar 87	д Ту	c CA	A AC	G TC	C AG r Ar 87	g A	T GTZ	A 1416 l
T'I Pì	rc Cl	eu Va	TT GG	SC CA	AT GA .s As	T TC p Se	G CT r Le	u Gl	A CA n Gl	A CT n Le	C GG u Gl	FA AB LI V. 28	.e 61	u As	AT AC	T 1464 r
T)		AAAG	TATA	G ATT	rgcag	GAG	ccc	GGCF	AA A	\TTTT	TGAC	T T	ATTG0	GTA(3	1517

GATGC	ATCG	A GC	TGAC	ACTA	AAC	CATG	ATT '	TTAC	CAGT'	TA CA	TAC	AACGI	TTI	TAAT	ATTE	1577
TACGG																1637
CATCA																1697
																1737
AGACI	CATAC	A TG	GGAC	CATC	ATA	AICG	CGG	CCGC	.GAA.	10						
(2)	ANG.	ABEN	ı zu	SE	Q II	NO NO	: 4	•								
			SEQ (A) (B) (D)	LÄN ART	GE: : Ar	447 nino	Am säu	inos re		en						
	(ii (xi	.) Al	RT I EQUE	ES ENZB	MOLI ESCI	EKÜI HRE I	s: BUN	Pro G:	teir SEQ	ID]	10:	4:				
Met 1	Arg	Gly .	Asn :	Lys 5	Phe	Cys (Cys I	Asp	Phe 3	Arg T	yr I	Leu I	eu I	lle 1 15	Leu	
Ala	Ala	Val	Ala 20	Phe	Ile	Tyr '	Thr	Gln 25	Met .	Arg I	Leu 1	Phe A	Ala 7 30	Thr (Gln	
Ser	Glu	Tyr 35	Ala	Asp	Arg	Leu	Ala 40	Ala	Ala	Ile (Glu 2	Ala (Glu A	Asn	His	
Cys	Thr 50	Ser	Gln	Thr	Arg	Leu 55	Leu	Ile	Asp	Gln	Ile 60	Ser 1	Leu	Gln	Gln	
Gly 65	Arg	Ile	Val	Ala	Leu 70	Glu	Glu	Gln	Met	Lys 75	Arg	Gln	Asp	Gln	Glu 80	
Cys	Arg	Gln	Leu	Arg 85	Ala	Leu	Val	Gln	Asp 90	Leu	Glu	Ser	Lys	Gly 95	Ile	
Lys	Lys	Leu	Ile 100	Gly	Asn	Val	Gln	Met 105	Pro	Val	Ala	Ala	Val 110	Val	Val	
Met	Ala	Cys 115	Asn	Arg	Ala	Asp	Tyr 120	Leu	Glu	Lys	Thr	Ile 125	Lys	Ser	Ile	
Leu	Lys 130		Gln	Ile	Ser	Val 135	Ala	Ser	Lys	Tyr	Pro 140	Leu	Phe	Ile	Ser	
Glr 145		Gly	Ser	His	Pro 150	Asp	Val	Arg	Lys	Leu 155	Ala	Leu	Ser	Tyr	Asp 160	
Glr	ı Lev	Thr	Tyr	Met 165	Gln	His	Leu	Asp	Phe 170	: Glu	Pro	Val	His	Thr 175	Glu	
Ar	g Pro	Gly	/ Glu 180		ılle	: Ala	Туг	Tyr 185	Lys	lle	Ala	Arg	His 190	Tyr	Lys	
Tr	p Ala	a Let 195		Glr	ı Lev	ı Ph€	тул 200	Lys	s His	s Asn	Phe	Ser 205	Arg	Val	Ile	
11	e Le		u Asp	Asp	o Met	c Glu 215	ı Ile	e Ala	a Pro	o Asp	220	Phe	Asp	Phe	Phe	

Glu Ala Gly Ala Thr Leu Leu Asp Arg Asp Lys Ser Ile Met Ala Ile 225 230 235 240

Ser Ser Trp Asn Asp Asn Gly Gln Met Gln Phe Val Gln Asp Pro Tyr 245 250 255

Ala Leu Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met Leu Ser 260 265 270

Lys Ser Thr Trp Asp Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala Tyr Trp 275 280 285

Asp Asp Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Arg Gly Arg Gln Phe Ile 290 295 300

Arg Pro Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly Ser Ser 305 310 315

Leu Gly Gln Phe Phe Lys Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu Asn Asp 325 330

Val Gln Val Asp Trp Lys Ser Met Asp Leu Ser Tyr Leu Leu Glu Asp 340 345

Asn Tyr Val Lys His Phe Gly Asp Leu Val Lys Lys Ala Lys Pro Ile 355 360 365

His Gly Ala Asp Ala Val Leu Lys Ala Phe Asn Ile Asp Gly Asp Val 370 375 380

Arg Ile Gln Tyr Arg Asp Gln Leu Asp Phe Glu Asn Ile Ala Arg Gln 385 390 395

Phe Gly Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Ala Ala Tyr 405 410 415

Lys Gly Ile Val Val Phe Arg Tyr Gln Thr Ser Arg Arg Val Phe Leu 420 425 430

Val Gly His Asp Ser Leu Gln Gln Leu Gly Ile Glu Asp Thr 4435

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1854 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 - (iv) ANTISENSE: NEIN
 - (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Arabidopsis thaliana
 - (B) STAMM: Columbia
 - (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: reife Pflanzen
 - (F) GEWEBETYP: alle Gewebe

```
(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
       (A) BIBLIOTHEK: Lambda Uni-ZAP (EcoRI/XhoI) und
                  Lambda ACT (XhoI)
       (B) CLON(E): pBSK-Ara-GntI-full #8
 (ix) MERKMAL:
       (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
       (B) LAGE:1185..1193
       (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "Asn-Codon ist eine
              potentielle Glykosylierungsstelle"
              /product= "Konsensus Sequenz fuer
              N-Glykosylierung"
              /phenotype= "N-Glykane modulieren
              Proteineigenschaften"
              /standard_name= "N-Glykosylierungsstelle"
               /label= pot-CHO
              /note= "fehlt in tierischen GnTI-Sequenzen"
 (ix) MERKMAL:
        (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
        (B) LAGE: 135..1469
        (C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell
        (D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 135
               /function= "initiiert komplexe N-Glykane auf
               sekret. Glykoproteinen"
               /EC number= 2.4.1.101
               /product=
               "beta-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase I"
               /evidence= EXPERIMENTAL
               /gene= "cgl"
               /standard_name= "gntI"
               /label= ORF
               /note= "erste gntI-Sequenz aus Arabidopsis
          (unpubliziert)"
  (ix) MERKMAL:
        (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
         (B) LAGE: 19..134
  (ix) MERKMAL:
         (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
         (B) LAGE: 1470..1848
   (ix) MERKMAL:
         (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
         (B) LAGE: 157..215
         (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "Membrananker
                (Aminosäuren 8-27)"
                /product= "hydrophober Aminosäurebereich in
                /standard_name= "Membrananker eines Typ II
                Golgi-Proteins"
                /note= "durch Vergleich mit tierischen GnTI-
```

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature

Sequenzen identifiziert"

(B) LAGE:1..18

(D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "zur Herstellung einer cDNA-Bibliothek in Lambda ACT"
/product= "XhoI-cDNA-Adaptor" /number= 1

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 1849..1854
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "XhoI-cDNA-Adaptor" /number= 2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CTCG	AGGC	CA C	GAAG	GCCA	c cg	TTTT'	TGTT	ATA	ACGA	ACG	ACAC	CGTT:	rc A	AACA	ACTTC	60
CTTA	TAG	CT A	GCTC	CCTC	c cg	GCGG	CAAA	CAC	CAGA	AGA	TCCA	CCGC'	TT T	IGAT	CTGGT	120
TGTT	IGTC	GT C	GAT	ATG Met 1	GCG Ala	AGG Arg	ATC Ile	TCG Ser 5	TGT Cys	GAC Asp	TTG Leu	AGA ' Arg '	TTT (Phe :	CTT Leu	CTC Leu	170
ATC	CCG Pro	GCA Ala 15	GCT Ala	TTC Phe	ATG Met	TTC Phe	ATC Ile 20	TAC Tyr	ATC Ile	CAG Gln	ATG Met	AGG Arg 25	CTT Leu	TTC Phe	CAG Gln	218
ACG Thr	CAA Gln 30	TCA Ser	CAG Gln	TAT Tyr	GCA Ala	GAT Asp 35	CGC Arg	CTC Leu	AGT Ser	TCC Ser	GCT Ala 40	ATC Ile	GAA Glu	TCT Ser	GAG Glu	266
AAC Asn 45	CAT His	TGC Cys	ACT Thr	AGT Ser	CAA Gln 50	ATG Met	CGA Arg	GGC Gly	CTC Leu	ATA Ile 55	GAT Asp	GAA Glu	GTT Val	AGC Ser	ATC Ile 60	314
AAA Lys	CAG Gln	TCG Ser	cgg Arg	ATT Ile 65	GTT Val	GCC Ala	CTC Leu	GAA Glu	GAT Asp 70	ATG Met	AAG Lys	AAC Asn	CGC Arg	CAG Gln 75	GAC Asp	362
GAA Glu	GAA Glu	CTT Leu	GTG Val 80	CAG Gln	CTT Leu	AAG Lys	GAT Asp	CTA Leu 85	ATC Ile	CAG Gln	ACG Thr	TTT Phe	GAA Glu 90	AAA Lys	AAA Lys	410
GGA Gly	ATA Ile	GCA Ala 95	Lys	CTC Leu	ACT Thr	CAA Gln	GGT Gly 100	Gly	CAG Gln	ATG Met	CCT Pro	GTG Val 105	GCT Ala	GCT Ala	GTA Val	458
GTG Val	GTT Val 110	Met	GCC Ala	TGC	AGT Ser	CGT Arg 115	GCA Ala	GAC Asp	TAT Tyr	CTT Leu	GAA Glu 120	AGG Arg	ACT Thr	GTT Val	AAA Lys	506
TCA Ser 125	Val	TTA Leu	ACA Thr	TAI Tyr	CAA Gln 130	Thr	CCC	GTI Val	GCT Ala	TCA Ser 135	Lys	TAT Tyr	CCT Pro	CTA Leu	TTT Phe 140	554
ATA Ile	TCI Ser	CAG Glr	GAT Asp	GGF Gly 145	/ Ser	GAT Asp	CAA Glr	GCT Ala	GTC Val	. Lys	G AGO	AAG Lys	TCA Ser	TTG Leu 155	AGC Ser	602

	TAT Tyr	TAA Asn	CAA Gln	TTA Leu 160	ACA Thr	TAT Tyr	ATG Met	Gln	CAC His 165	TTG Leu	GAT Asp	TTT Phe	GAA Glu	CCA Pro 170	GTG Val	GTC Val		650
	ACT Thr	GAA Glu	AGG Arg 175	CCT Pro	GGT Gly	GAA Glu	CTG Leu	ACT Thr 180	GCG Ala	TAC Tyr	TAC Tyr	AAG Lys	ATT Ile 185	GCA Ala	CGT Arg	CAC His		698
	TAC Tyr	AAG Lys 190	TGG Trp	GCA Ala	CTG Leu	GAC Asp	CAG Gln 195	TTG Leu	TTT Phe	TAC Tyr	AAA Lys	CAC His 200	AAA Lys	TTT Phe	AGT Ser	CGA Arg		746
	GTG Val 205	ATT	ATA Ile	CTA Leu	GAA Glu	GAC Asp 210	GAT Asp	ATG Met	GAA Glu	ATT Ile	GCT Ala 215	CCA Pro	GAC Asp	TTC Phe	TTT Phe	GAT Asp 220		794
)	TAC	TTT Phe	GAG Glu	GCT	GCA Ala 225	GCT Ala	AGT Ser	CTC Leu	ATG Met	GAT Asp 230	AGG Arg	GAT Asp	AAA Lys	ACC Thr	ATT Ile 235	ATG Met		842
	GCT Ala	GCT Ala	TCA Ser	TCA Ser 240	Trp	AAT Asn	GAT Asp	AAT Asn	GGA Gly 245	CAG Gln	AAG Lys	CAG Gln	TTT Phe	GTG Val 250	HTE	GAT Asp		890
·	CCC Pro	TAI	GCC Ala 25!	a Lev	TAC Tyr	CGA Arg	TCA Ser	GAT Asp 260	Phe	TTT Phe	CCT Pro	GGC Gly	CTT Leu 265	GIY	TG	ATG Met		938
	CTC Lev	270	a Ar	A TCC	ACI Thr	TGG	GAT Asp 275	Glu	TTA Leu	TCA Ser	CCA Pro	AAQ Lys 280	Tr	CCP Pro	AA(G GCT B Ala		986
	TAC Ty: 285	Tr	G GA	T GA:	T TGG	290	Arg	CTA Leu	AAG Lys	GAA Glu	AAC Asr 295	n His	r AA! s Ly:	A GGG	C CG	g Gln 300	1	1034
و ر	TT(C AT	T GC e Al	A CCC a Pro	G GA O Gli 30!	Val	TGT L Cys	r AGA s Arg	A ACI	TAC Ty:	Ası	r TT:	r GG e Gl	T GA	A CA u Hi 31	T GGG s Gly 5	;	1082
	TC' Se:	r AG r Se	T TT r Le	G GG u Gl 32	y Gl	G TT:	T TT(∋ Pho	C AG1	CAC CGl:	n Ty	r Le	G GA u Gl	A CC u Pr	T AT o Il 33	е га	G CT?	A 1	1130
	AA As	C GA n As	T GI p Va 33	l Th	G GT r Va	T GA	C TG	G AAI p Ly: 34	s Al	A AA a Ly	G GA s As	C CT p Le	G GG u G1 34	у ту	C CI r L∈	G AC	A r	1178
	GA Gl	G GG u G]	у Аз	AC TA	T AC	C AA r Ly	G TA s Ty 35	r Ph	T TC e Se	T GG r Gl	C TT y Le	A GI u Va 36	l Ar	A CA	A GC	CA CG La Ar	a g	1226
	CC Pr 36	o I	TT C	AA GO ln Gl	T TO Ly Se	T GA er As	p Le	T GT u Va	C TT	A AA u Ly	G GC s Al	.a G)	AA AA .n As	AC AI	A Al Le Ly	AG GA s As 38	P	1274
	G <i>P</i>	AT G	AT C	GT AT	rc co le Ar 38	g Ty	T AA	LA GA 's As	C CA	A GI n Va 39	1 G	AG TI Lu Pl	rT GA ne Gi	AA CO lu Ai	rg 1	TT GC le Al 95	A a	1322

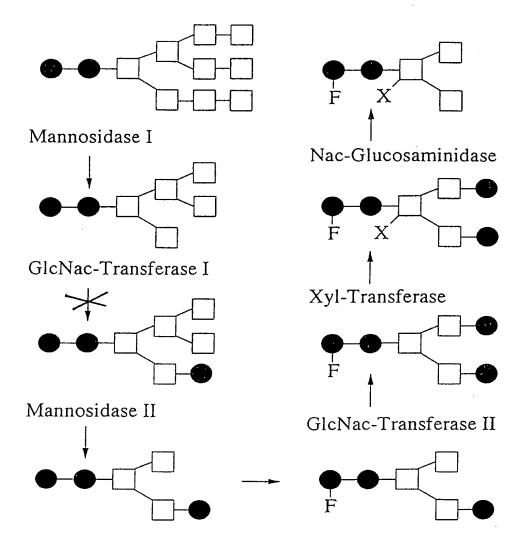
Gly Gl	A T	ne Gl	T AT Ly Il	A TI	rt GA ne Gl	A GA u Gl	u Tı	GG AF rp Ly D5	AG GA 78 As	AT GO	GT G'	al P	CA CO ro A: 10	GA A rg T	CA hr	1370
GCA TA	r L	AA G ys G: 15	GA GT ly Va	ra G'	TG GT al Va	G TI al Ph 42	ne A	GA A: rg I:	rc c le G	AG A	hr T	CA A hr A 25	GA C rg A	GT G rg V	TA al	1418
TTC CT Phe Le	rg g ≥u V 30	TT G	GG CG ly P:	CA G	sp Se	CT GT er Va 35	ra a' al m	TG C et G	AG C' ln L	eu G	GA A ly I 40	TT C	GA A	AT I	ecc Ser	1466
TGA TO * 445	GCAA	AACA	TA T	GAAA	.GGAA	AAG	AAGA	TTT	TGGA	CCGC	TA:	CAGC	CTCC	T		1519
TCTAG	CAGO	T GI	TAGG	TTGI	TTA	GTTA'	TTT	ATGG	ATGA	GT I	TGT	AGAGO	CG GI	reee	GTTAA	1579
CTTTA	ACAG	C AA	GGAA	GCTC	TGG	TGAC	CAG	GCTG	ATTG	GC I	TAG	AAGT:	TA TO	GGA	ACCCC	1639
TTGAA	AGGO	T C	AGGGI	KAAT	TAT	TTTA	CAG	TTGI	TTTA	ATT #	GTG	ATTA!	rc T	rgtg	GGTAA	1699
CTTAT	'ACG!	T A	CAAA	TCAT	r TCT	ATGC	AGT	TTTT	CTTC	CGT (CCCA	CTTG	TT T	rggc	TTCTC	1759
TATTG	CTA	GT G	racai	'ATC	r CTI	CAAA	CAT	GTAC	TAAI	ATA A	ATGC	GTGT	TG C	TTCA	AAGAA	1819
GTAAC	TTT	TA T	TAAAT	AAA	A AAA	AAAA	AAC	TCG	AG							1854
(2)	ANG	ARE	N 71	SE	O TI) NO	. 6	•								
(2)		(i)	SEQ (A) (B) (D)	UEN LÄN ARI TOF	IZKEI IGE: POLO	NNZE 445 minc GIE:	EICH 5 Am 5 Säu 1 li	IEN: nino nre nea	r							
(2)	(ii	(i)	SEQ (A) (B) (D)	UEN LÄN ARI TOF	IZKEI IGE:	NNZE 445 minc GIE: EKÜI	EICH S Am S au S li	IEN: nino re nea Pro	r tei	n	NO:	6:				
Met i	(ii (xi	(i) i) A	SEQ (A) (B) (D) RT I	QUEN LÄN ART TOF DES ENZE	IZKEI IGE: POLO MOL	NNZE 445 minc GIE: EKÜI HRE]	EICH S Am S äu E li LS: [BUN	IEN: nino re nea Pro	r tei: SEQ	n ID			Pro	Ala 15	Ala	
Met 1	(ii (xi Ala	(i) i) A i) S	SEQ (A) (B) (D) RT I EQUI	QUEN LÄN ART TOF DES ENZF	IZKEI IGE: POLO MOL	NNZE 445 minc GIE: EKÜI HREI	EICH S Am S au S li LS: [BUN	IEN: nino nre nea Pro NG:	r teil SEQ Phe 10	n ID Leu	Leu	Ile		12		
Met 1 1 Phe	(ii (xi Ala Met	(i) Ai) S Arg	SEQ (A) (B) (D) RT I EQUI	QUEN LÄN TOF TOF ENZF	IZKEI IGE: C: Ai POLO MOL BESC	NNZE 445 minc GIE: EKÜI HREI Asp	EICH S Am S S S S S S S S S S S S S S S S S S S	IEN: nino nre nea Pro NG: Arg Arg	r teil SEQ Phe 10 Leu	n ID Leu Phe	Leu Gln	Ile Thr	Gln 30	Ser	Gln	
Met 1 Phe	(ii (xi Ala Met Ala	(i) Ai) S Arg Phe Asp 35	SEC (A) (B) (D) RT I EQUI Ile 20	QUEN LÄN ART TOF DES EN ZF Ser 5	IZKEN IGE: An POLOG MOL BESC Cys	NNZE 445 minc GIE: EKÜI HREI Asp	EICH S Am D Säu LS: LBUN Leu Met Ala 40	IEN: nino nre nea Pro NG: Arg 25	r teil SEQ Phe 10 Leu Glu	n ID Leu Phe Ser	Leu Gln Glu	Thr Asn 45	Gln 30 His	Ser Cys	Gln	
Met 1 Phe Tyr	(ii (xi Ala Met Ala Gln 50	(i) Ai) S Arg Phe Asp 35 Met	SEC (A) (B) (D) RT I EQUI Ile 20 Arg	QUEN LÄN ART TOF DES ENZF Ser 5 Tyr	IZKENIGE: C: An POLOG MOL: BESC: Cys Ile Ser Leu	NNZE 445 minc GIE: EKÜI HREI Asp	EICH S Am S Säu LS: [BUN Leu Met Ala 40 Asp	IEN: nino nre nea Pro NG: Arg 25 Ile Glu	r teil SEQ Phe 10 Leu Glu Val	n ID Leu Phe Ser	Leu Gln Glu Ile 60 Asp	Thr Asn 45	Gln 30 His	Ser Cys	Gln	
Met 1 Phe Tyr Ser Ile 65	(ii (xi Ala Met Ala Gln 50 Val	(i) Ai) S Arg Phe Asp 35 Met	SEC (A) (B) (D) RT I EQUI Ile 20 Arg Arg	QUEN LÄN ART TOF DES ENZF Ser 5 Tyr	IZKENIGE: C: An POLOG MOLGSESC: Cys Ile Ser Leu Asp 70 Ile	NNZE 445 minc GIE: EKÜI HREI Asp Gln Ser Ile 55 Met	EICH S Am S Säu ES: [BUN Leu Met Ala 40 Asp	IEN: lino lre lnea Pro IG: Arg Arg 25 Ile Glu Asn	r teil SEQ Phe 10 Leu Glu Val	n ID Leu Phe Ser Ser Gln 75 Lys	Gln Glu Ile 60 Asp	Thr Asn 45 Lys	Gln 30 His Gln	Ser Cys Ser	Gln Thr Arg Val 80	

 \mathbb{R}^{J}

- Cys Ser Arg Ala Asp Tyr Leu Glu Arg Thr Val Lys Ser Val Leu Thr
- Tyr Gln Thr Pro Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe Ile Ser Gln Asp 130 135 140
- Gly Ser Asp Gln Ala Val Lys Ser Lys Ser Leu Ser Tyr Asn Gln Leu 145 150 155 160
- Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Phe Glu Pro Val Val Thr Glu Arg Pro 165 170 175
- Gly Glu Leu Thr Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His Tyr Lys Trp Ala 180 185 190
- Leu Asp Gln Leu Phe Tyr Lys His Lys Phe Ser Arg Val Ile Ile Leu 195 200 205
- Glú Asp Asp Met Glu Ile Ala Pro Asp Phe Phe Asp Tyr Phe Glu Ala 210 215 220
- Ala Ala Ser Leu Met Asp Arg Asp Lys Thr Ile Met Ala Ala Ser Ser 225 230 235 240
- Trp Asn Asp Asn Gly Gln Lys Gln Phe Val His Asp Pro Tyr Ala Leu 245 250 255
- Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met Leu Lys Arg Ser 260 265 270
- Thr Trp Asp Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala Tyr Trp Asp Asp 275 280 285
- Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Lys Gly Arg Gln Phe Ile Ala Pro 290 295 300
- Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly Ser Ser Leu Gly 305 310 315 320
- Gln Phe Phe Ser Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu Asn Asp Val Thr 325 330 335
- Val Asp Trp Lys Ala Lys Asp Leu Gly Tyr Leu Thr Glu Gly Asn Tyr 340 345 350
- Thr Lys Tyr Phe Ser Gly Leu Val Arg Gln Ala Arg Pro Ile Gln Gly 355 360 365
- Ser Asp Leu Val Leu Lys Ala Gln Asn Ile Lys Asp Asp Asp Arg Ile 370 375 380
- Arg Tyr Lys Asp Gln Val Glu Phe Glu Arg Ile Ala Gly Glu Phe Gly 385 390 395 400
- Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Thr Ala Tyr Lys Gly
 405 410 415
- Val Val Phe Arg Ile Gln Thr Thr Arg Arg Val Phe Leu Val Gly 420 425 430

Pro Asp Ser Val Met Gln Leu Gly Ile Arg Asn Ser * 435 440 445

Figur 1



Fuc-Transferase

A1 GntI cDNA

GAAT	TCGC	GG C	ccc	TGAG	A AA	CCCT	CGAA	TTC	እ ል ፐፐ	TCG (CATT"	TGGC	ag a		G t 1	55
AGA Arg	GGG Gly	AAC Asn	AAG Lys 5	TTT Phe	TGC Cys	TTT Phe	GAT Asp	TTA Leu 10	CGG Arg	TAC Tyr	CTT Leu	CTC (Leu	GTC Val 15	GTG Val	GCT Ala	103
GCT Ala	CTC Leu	GCC Ala 20	TTC Phe	ATC Ile	TAC Tyr	ATA Ile	CAG Gln 25	ATG Met	CGG Arg	CTT Leu	TTC Phe	GCG Ala 30	ACA Thr	CAG Gln	TCA Ser	151
GAA Glu	TAT Tyr 35	GTA Val	GAC Asp	CGC Arg	CTT Leu	GCT Ala 40	GCT Ala	GCA Ala	ATT Ile	GAA Glu	GCA Ala 45	GAA Glu	AAT Asn	CAT His	TGT Cys	199
ACA Thr 50	AGT Ser	CAG Gln	ACC Thr	AGA Arg	TTG Leu 55	CTT Leu	ATT Ile	GAC Asp	AAG Lys	ATT Ile 60	AGC Ser	CAG Gln	CAG Gln	CAA Gln	GGA Gly 65	247
AGA Arg	GTA Val	GTA Val	GCT Ala	CTT Leu 70	GAA Glu	GAA Glu	GIII	ATG Met	AAG Lys 75	CAT His	CAG Gln	GAC Asp	CAG Gln	GAG Glu 80	TGC Cys	295
CGG Arg	CAA Gln	TTA Leu	AGG Arg 85	Ala	CTT Leu	GTT Val	CAG Gln	GAT Asp 90	Leu	GAA Glu	AGT Ser	AAG Lys	GGC Gly 95	ATA Ile	AAA Lys	343
AAG Lys	TTA Leu	ATC 116	e Gly	GAT Asp	GTG Val	CAG Gln	ATG Met 105	PLO	GTG Val	GCA Ala	GCT Ala	GTA Val 110	GTT Val	GTT Val	ATG Met	391
GCT Ala	TGC Cys	Se	r CGT r Arg	T ACT	GAC Asp	TAC Tyr 120	Leu	GAG Glu	AGG Arg	ACT Thr	ATT Ile 125	- 2	TCC	: ATC	TTA Leu	439
AAA Lys 130	туг	CA Gli	A ACA	A TCT	GTT Val	Ala	TCA Ser	AAA Lys	TAT Tyr	CCT Pro 140	БСС	TTC Phe	ATA Ile	TCC Ser	CAG Gln 145	487
GAT Asp	r GG/ o Gly	TC.	A AA' r Ası	r cci n Pro 150	o Asp	GTA Val	A AGA L Arg	A AAC J Lys	CTI Leu 155	, AIC	TTG Lev	AGC Ser	TAT Tyi	GGT Gly 160	CAG Gln	535
CT(G ACC	G TA	T ATO r Me 16	t Gli	G CAC	TTO Lev	I ASI) IV	LGIL		, ,,,,	CAT His			A AGA 1 Arg	583
CC. Pr	A GGG	G GA y Gl 18	u Le	G GT u Va	T GC	А ТА а Ту	TAC TY	r ny	G AT	r GCZ e Ala	A CGT a Arg	r CAT g His 190	-	C AAG r Ly:	G TGG S Trp	631
GC Al	A TT a Le 19	u As	AT CA	G CT n Le	G TT u Ph	T CA e Hi 20	s rà	G CA s Hi	T AA' s As:	T TT' n Ph	T AGG e Se: 20!		r GT g Va	T AT 1 I1	C ATA e Ile	679
CT Le 21	u Gl	A GA u As	AT GA	TA TA eM q	G GA et Gl 21	u 11	T GC e Al	T GC a Al	T GA a As	T TT p Ph 22		T GA e As	с та р Ту	T TT r Ph	T GAG e Glu 225	727

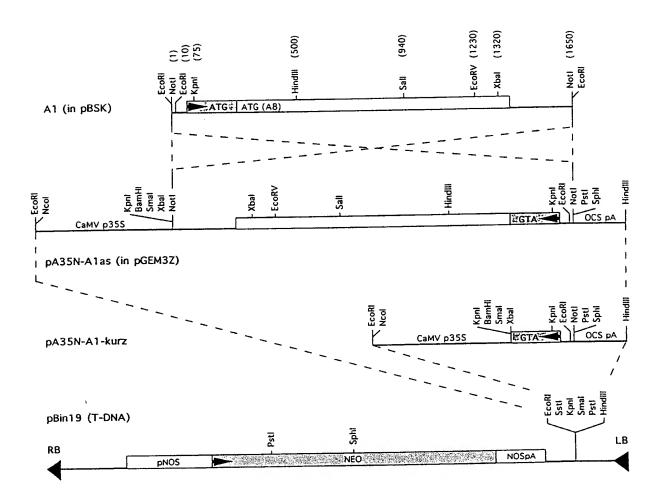
Figur 2 (Fortsetzung)

GCT Ala	GGA Gly	GCT Ala	ACT Thr	CTT Leu 230	CTT Leu	GAC Asp	AGA Arg	GAC Asp	AAG Lys 235	TCG Ser	ATT Ile	ATG Met	<u>GCT</u> Ala	ATT Ile 240	TCT Ser	775
									TTC Phe							823
CTT Leu	TAC Tyr	CGC Arg 260	TCA Ser	<u>GAC</u> Asp	TTT Phe	TTT Phe	CCT Pro 265	GGT Gly	CTT Leu	GGA Gly	TGG Trp	ATG Met 270	CTT Leu	TCA Ser	AAA Lys	871
TCA Ser	ACT Thr 275	TGG Trp	TCC Ser	GAA Glu	CTA Leu	TCT Ser 280	CCA Pro	AAG Lys	TGG Trp	CCA Pro	AAG Lys 285	GCT Ala	TAC Tyr	TGG Trp	GAT Asp	919
GAC Asp 290	TGG Trp	CTA Leu	AGG Arg	CTG Leu	AAA Lys 295	GAA Glu	AAT Asn	CAC His	AGA Arg	GGT Gly 300	CGA Arg	CAA Gln	TTT Phe	ATT Ile	CGC Arg 305	967
									GGT Gly 315							1015
GGG Gly	CAG Gln	TTT Phe	TTT Phe 325	AAG Lys	CAG Gln	TAT Tyr	CTT Leu	GAG Glu 330	CCA Pro	ATT Ile	AAG Lys	CTA Leu	AAT Asn 335	GAT Asp	GTC Val	1063
									AGT Ser							1111
									AAA Lys							1159
GGA Gly 370	GCT Ala	GAT Asp	GCT Ala	GTT Val	TTG Leu 375	AAA Lys	GCA Ala	TTT Phe	AAC Asn	ATA Ile 380	GAT Asp	GGT Gly	GAT Asp	GTG Val	CGT Arg 385	1207
									GAA Glu 395							1255
		Phe		Glu	Trp		Asp	Gly	GTA Val	Pro		Ala	Ala	Tyr		1303
									TCT Ser		Arg				GTT Val	1351
TCC Ser	CCT Pro 435	GAT Asp	TCT Ser	CTT Leu	CGA Arg	CAA Gln 440	CTT Leu	GGA Gly	GTT Val	GAA Glu	GAT Asp 445	ACT Thr	TAG End			1393
CGAA	GATA	ATG A	TTGC	AGCC	T GA	GCAA	CAAT	ATT :	GACT	TAT	TTGG	TAGO	AT A	CATI	TGAAA	1453
GAGO	TGAC	CAC G	AAAA	GTA1	'G AC	TACC	AGTA	GCI	CACAT	GCA	ACAT	TTTP	AT C	TTA	NTGGAA	1513
GGAA	ACCCA	CT G	CTTA	TTGI	T GG	AATG	GATO	AAT	CATO	ACC	ACAT	CCTA	TT A	ATTC?	\AGTTT	1573
ACAA	ACAI	AA A	GAGG	RAAT	G TI	GCCC	TATA	AAA	YACAY	TTA	TTTT	GTTI	CT A	\AGA#	AGGAAC	1633
GTTA	CGAI	TA I	GAGC	AACI	T TG	GCGG	cccc	GAA	TTC							1669

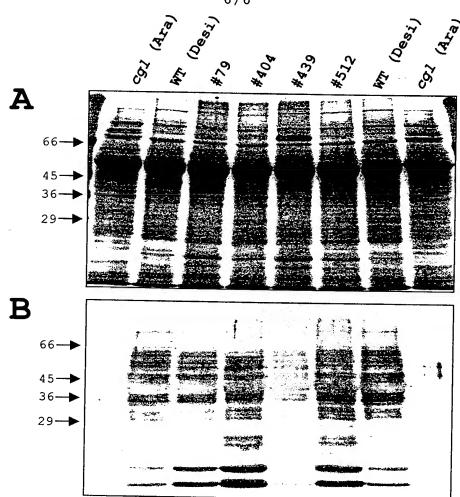
Hu	Ra	Mo	Ce	
35	36	35	33	Şt
(59)	(57)	(59)	(57)	
2002000	92	91	38	Hu
	(95)	(94)	(57)	
	<u> </u>	90	38	Ra
		(93)	(57)	
			38	Mo
			(58)	

Figur 3B

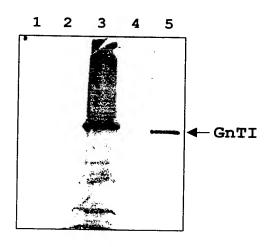
A_Stb-Al	1 MRGNKFCFDLRYLLWAAMAFIYIQMRLFATQSEYVDRLAAAIEAENHCT
B_Ntb-A9	1 MRGNKFCCDFRYLLIMAAMAFIYTQMRLFATQSEYADRLAAAIEAENHCT
C_Atb-Full	1MARISCDLRMLLIPAAFMFIYIQMRLFQTQS@YADRLSSAIESENHCT
A_Stb-Al	51 SQTRLLIDKISQQQGRWVALEEQMKEQDQECRQLRALVQDLESKGIKKLI
B_Ntb-A9	51 SQTRLLIDGISHQQGRIVALEEQMKRQDQECRQLRALVQDLESKGIKKLI
C_Atb-Full	49 SQMRGLIDEVSEKQSRIVALEEMKNRQDEELVQLKDLEQTFEKKGIAKL
A_Stb-A1	101 GDVQMPVAAVVVMACSREDYLERTIKSILKYQTSVASKYPLFISQDGSNP
B_Ntb-A9	101 GNVQMPVAAVVVMACNRADYLEETIKSILKYQISVASKYPLFISQDGSEP
C_Atb-Full	99 QGGQMPVAAVVVMACSRADYLERT所KS阿LTYQTPVASKYPLFISQDGSEQ
A_Stb-A1	DVRKLALSYGOLTYMOHLDMEPVHTERPGELMAYYKIARHYKWALDOLFH
B_Ntb-A9	DVRKLALSYDOLTYMOHLDFEPVHTERPGELMAYYKIARHYKWALDOLFY
C_Atb-Full	149 AVKSKSLSYNOLTYMOHLDFEPVVTERPGELTAYYKIARHYKWALDOLFY
A_Stb-Al B_Ntb-A9 C_Atb-Full	KHNFSRVIILEDDMEIAADFFDYFEAGATLLDRDKSIMAISSWNDNGQEQ KHNFSRVIILEDDMEIAPDFFDEFEAGATLLDRDKSIMAISSWNDNGQEQ KHKFSRVIILEDDMEIAPDFFDYFEAEASLEDDRDKEIMAESSWNDNGQEQ
A_Stb-Al	251 FVQDPDALYRSDFFPGLGWMLSKSTWSELSPKWPKAYWDDWLRLKENHRG
B_Ntb-A9	251 FVQDPYALYRSDFFPGLGWMLSKSTWDELSPKWPKAYWDDWLRLKENHRG
C_Atb-Full	249 FVHDPYALYRSDFFPGLGWMLKRSTWDELSPKWPKAYWDDWLRLKENHRG
A_Stb-A1	ROFIRPEVCRTYNFGEHGSSLGOFFKOYLEPIKLNDVOVDWKSMDLSYLL
B_Ntb-A9	ROFIRPEVCRTYNFGEHGSSLGOFFKOYLEPIKLNDVOVDWKSMDLSYLL
C_Atb-Full	ROFIAPEVCRTYNFGEHGSSLGOFFSOYLEPIKLNDVTVDWKKKDLGYLT
A_Stb-Al	251 EDNYVKHFGDLVKKAKPIHGADAVLKAFNIDGDVRIQYRDQLDFENIARQ
B_Ntb-A9	351 EDNYVKHFGDLVKKAKPIHGADAVLKAFNIDGDVRIQYRDQLDFENIARQ
C_Atb-Full	349 EGNYTKYFSGLVEQARPIQGSDLVLKAQNIKDDDRIRYEDQVAFFERIAGE
A_Stb-Al B_Ntb-A9 C_Atb-Full	FGIFEEWKDGVPRAAYKGIVVFREQTSRRVFLVSPDSLRQLGMEDT FGIFEEWKDGVPRAAYKGIVVFREQTSRRVFLVGEDSLOQLGIEDT FGIFEEWKDGVPREAYKGWVVFRIQTERRVFLVGPDSMOLGIRMS







Figur 6



PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT	То:			
NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY WUZSTHOFF & WUZSTHOF (PCT Rule 24:2(a)) NO RECHTS ANWALTE 1 8. MRZ 1999	ALLEMAGNE			
Date of mailing (day/month/year) 05 March 1999 (05.03.99)	IMPORTANT NOTIFICATION			
Applicant's or agent's file reference EP-81 607PCT ✓	International application No. PCT/EP98/08001			
The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below. Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants: VON SCHAEWEN, Antje (all designated States) International filing date : 09 December 1998 (09.12.98) Priority date(s) claimed : 09 December 1997 (09.12.97) Date of receipt of the record copy by the International Bureau : 19 February 1999 (19.02.99) List of designated Offices : EP :AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE National :AU,CA,JP,US ATTENTION The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau. In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to: X time limits for entry into the national phase				
Tequirements regarding priority documents A copy of this Notification is being sent to the receiving Office	and to the International Searching Authority.			

Authorized officer:

Telephone No. (41-22) 338.83.38

N. Fischer

Facsimile No. (41-22) 740.14.35 Form PCT/IB/301 (July 1998)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes

1211 Geneva 20, Switzerland

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is 20 MONTHS from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, 30 MONTHS from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszuführe.

PCT/EP 9 8 / 0 8 0 0 1

Internationales Aktenzeichen

(0.9, 12, 1998)

0 9 DEC 1998

Internationales Anmeldedatum

EUROPEAN PATERT OFFICE
PCT INTERNATIONAL APPLICATION

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht) (max. 12 Zeichen) EP-81 607 PCT

fo/EP

Fold No. 1 RETEICH	NUNC DER ERF	INDUNG Pflanz	liche GntI-S	Sequenzen und Verwendung
derselben zur N-Acetylgluco	Gewinnung saminyltra	von Pflanz insferase I	en mit vermi (GnTI)-Aktiv	inderter oder fehlender vität
Feld Nr. II ANMELI	DER			
Name und Anschrift: (Famili Bei der Anschrift sind die I Anschrift angegebene Staat i Staat des Sitzes oder Wohnsi	enname, Vorname: bei j Ostleitzahl und der Na st der Staat des Sitzes o tzes angegeben ist.)	uristischen Personen vollstä ne des Staats anzugeben. der Wohnsitzes des Anmeld	indige amtliche Bezeichnung Der in diesem Feld in de ers, sofern nachstehend kei	Diese Person ist gleichzeitig Erfinder
COUNTRIES	ı Antio			Telefornu
von SCHAEWER Natruper St 49076 Osnab	caße 169a			Telefaxnr.:
[Deutschland	(DE)			Fernschreibnr.:
Staatsangehörigkeit (St	aat):		Sitz oder Wohnsitz (S	Staat):
DE DE			DE	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:	X alle Bestim- mungsstaaten	alle Bestimmungssta der Vereinigten Staa	naten mit Ausnahme nten von Amerika	nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten
Feld Nr. III WEITE	RE ANMELDER	UND/ODER (WEITH	ERE) ERFINDER	
Bei der Anschrift sind ale Anschrift angegebene Staat Staat des Sitzes oder Wohn:	itzes angegeben ist.)		·	nur Anmelder Anmelder und Erfinder nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)
Staatsangehörigkeit (S	taat):		Sitz oder Wohnsitz (Staat):
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:	alle Bestim- mungsstaaten	alle Bestimmungss der Vereinigten Sta	taaten mit Ausnahme aaten von Amerika	nur die Vereinigten die im Zusatzfeld angegebenen Staaten
Weitere Anmeld	er und/oder (weiter	e) Erfinder sind auf ein	nem Fortsetzungsblatt	angegeben.
Feld Nr. IV ANWA	LT ODER GEME	INSAMER VERTRE	TER; ODER ZUSTE	LLANSCHRIFT
Die folgende Person w vor den zuständigen ir	ird hiermit bestellt/is ternationalen Behör	st bestellt worden, um i den in folgender Eiger	für den (die) Anmelder nschaft zu handeln als:	X Anwalt gemeinsamer Vertreter
			rsonen vollständige amtlic ahl und der Name des Sta	
WIBBELMANN, WUESTHOFF &	Jobst WUESTHOFF	,		Telefaxnr.:
Schweigerst 81541 Münch	raße 2			089 / 62 18 00-15 Fernschreibnr.:
Defutschland	17			
Zustellanschrif	t: Dieses Kästchen i	st anzukreuzen, wenn k schrift angegeben ist.	ein Anwalt oder gemei	nsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im

D/EP

Feld N	r. V	BESTIMMUNG VON STAATEN						
Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):								
• "								
Region			anin	1 6	Lecatho MW Malawi SD Sudan S7 Swasiland			
Ц	Aľ	ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist						
	EA		TM		elarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik menistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des			
X	EP	Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist						
	OA	OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentrali GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (fall	afrika , NE s eine d	nisch Niger <i>indere</i>	e Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte			
Nationa	iles Pat	auf der gepunkteten Linie angeben) ent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahr			t wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):			
_		Albanien			Lesotho			
		Armenien			Litauen			
			=					
		Österreich			Lettland			
		Australien			Lettland Providity Malday			
		Aserbaidschan			Republik Moldau			
		Bosnien-Herzegowina			Madagaskar			
🖳	BB	Barbados		MK	Die ehemalige jugoslawische Republik			
	\mathbf{BG}	Bulgarien	_		Mazedonien			
	BR	Brasilien			Mongolei			
	BY	Belarus		MW	/ Malawi			
×	CA	Kanada		MX	Mexiko			
	CH	und LI Schweiz und Liechtenstein		NO	Norwegen			
	CN	China		NZ	Neuseeland			
=		Kuba		PL	Polen			
	CZ			РΤ	Portugal			
	DE	Deutschland		RO				
		Dänemark		RU	Russische Föderation			
	EE	Estland		SD	Sudan			
	ES	Spanien		SE	Schweden			
=		Finnland		SG	Singapur			
	FI			SI	Slowenien			
	GB	Vereinigtes Königreich						
	GE	Georgien			Slowakei			
	_	Ghana			Sierra Leone			
		Gambia		TJ	Tadschikistan			
	_	Guinea-Bissau			Turkmenistan			
		Kroatien			Türkei			
	HU	Ungarn		TT				
	ID	Indonesien			Ukraine			
	IL	Israel		UG	Uganda			
	IS	Island	X	US	Vereinigte Staaten von Amerika			
×	JP	Japan						
	KE	Kenia		UZ	Usbekistan			
	KG	Kirgisistan		VN	Vietnam			
	KP	Demokratische Volksrepublik Korea		YU				
					V Simbabwe			
	KR	Republik Korea	_		für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines			
丨片		Kasachstan			n Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung			
][LC				ormblatts beigetreten sind:			
		Sri Lanka						
!!][
1-1		Liberia	<u> </u>		Paginguages signed day Appelder pagh			
į Erl	darun	g bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich	ιu αe	u obe	in genannten bestimmungen nimmt der Anmeider nach			

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen. die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Feld Nr. VI PRIORITÄTSA	NSPRUCH	Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.				
Anmeldedatum	Aktenzeichen		Ist die frühere Anmeldu			
der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	der früheren Anmeldung	nationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung:* regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt		
Zeile(1) (09.12.97) 9. Dezember 1997	197 54 622.	(DE) 6 Deutschland	d			
Zeile (2)						
Zeile (3)						
Zene (3)						
bezeichneten früheren Anme	eldung(en) zu elstenen un	nrift der oben in der (den) Zei d dem internationalen Büro z ecke dieser internationalen An	meldung Anmeldeamt ist)	e frühere Anmeldung(en) bei		
* Falls es sich bei der früheren An. Mitgliedstaat der Pariser Verbands	meldung um eine ARIPO-An übereinkunft zum Schutz de	meldung handelt, so muß in a s gewerblichen Eigentums ist	em Zusatzfeld mindestens ei und für den die frühere A	n Staat angegeben werden, der nmeldung eingereicht wurde.		
	ONALE RECHERCHE		hnisse einer früheren Rech	erche; Bezugnahme auf diese		
Wahl der internationalen Recherch (falls zwei oder mehr als zwei inte	rnationale Recherchen- fr	withere Recherche (falls eine fre eantragt oder von ihr durchgeft	ühere Recherche bei der inte	rnationalen Recherchenbehörde		
behörden für die Ausführung der mi	en gewählte Behörde an:	eamragt oaer von in aarengej. Datum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Staat (oder regionales Amt)		
der Zweibuchstaben-Code kann benu	tzt werden):	· · ·				
ISA/ EPA	THE SINDERCHING	CCCDDACUE				
Feld Nr. VIII KONTROLL		ationalen Anmeldung liege	n die nachstehend angek	reuzten Unterlagen bei:		
Diese internationale Anmeldun die folgende Anzahl von Blätt		ür die Gebührenberechnun		•		
Antrag :		derte unterzeichnete Vollm				
Beschreibung (ohne	3 □ Konie	der allgemeinen Vollmach	t; Aktenzeichen (falls v	orhanden):		
Sequenzprotokomeny		ndung für das Fehlen einer				
Ansprüche :	e 🖂 Deionis	tätsbeleg(e), in Feld Nr. V	durch			
Zusammenfassung : Zeichnungen :	tolger	atsbeleg(e), in Feld (4), vide Zeilennummer gekenn: etzung der internationalen	Anmeldung in die folger	nde Sprache:		
Sequenzprotokollteil	6. Ubers	etzung der internationalen	Mikroorganismen oder a	nderem biologischen Material		
	17 / Geson	kall der Nucleatid- und/ade	er Aminosäuresequenzen	in computerlesbarer Form		
Blattzahl insgesamt :	. —	ige (einzeln aufführen):		•		
Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung		Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird:	Deutsch			
veröffentlicht werden soll (Nr.):	DIET DES ANMELDE	DE ODED DES ANWAL	rs			
Feld Nr. IX UNTERSCHE Der Name jeder unterzeichnend aus dem Antrag ergibt, in wel	den Person ist neben der	Unterschrift zu wiederholen,	und es ist anzugeben, so	ofern sich dies nicht eindeutig		
aus dem Antrag ergibt, in wel	cher Eigenschaft die Pe	rson unterzeichnet.				
München, den	9. Dezember 1					
	66					
	AL CAR	8)_				
	Dr. Jobs	t Wibbelmann atent Attorney	,			
	V	om Anmeldeamt auszufüll	en	10.00		
Datum des tatsächlichen internationalen Anmeldun	ig:	0 9 DEC 19	98 (-9.1	2. Zeichnungen Zeichnungen Seinge- gangen:		
3. Geändertes Eingangsdatur fristgerecht eingegangene zur Vervollständigung die				nicht ein- gegangen:		
4. Datum des fristgerechten I Richtigstellungen nach A	rtikel 11(2) PC1:		/n			
5. Internationale Rechercher (falls zwei oder mehr zus	tändig sind):		Übermittlung des Reche Zahlung der Rechercher	ngebühr aufgeschoben		
		Internationalen Büro ausz	ufüllen			
Datum des Eingangs des beim Internationalen Büro:	Aktenexemplars					

PATENT COOPERATION TREATY

W

WUESTHOFF&WUESTHOFF

PCT1 8, MRZ 1999

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

WIBBELMANN, Jobst Wuesthoff & Wuesthoff Schweigerstrasse 2 D-81541 Muenchen ALLEMAGNE



IMPORTANT NOTIFICATION
International filing date (day/month/year) 09 December 1998 (09.12.98)
Priority date (day/month/year) 09 December 1997 (09.12.97)

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- 2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date

Priority application No.

Country or regional Office or PCT receiving Office

Date of receipt of priority document

09 Dece 1997 (09.12.97) V 197 54 622.6 V

DE V

19 Febr 1999 (19.02.99)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

N. Fischer

Telephone No. (41-22) 338.83.38

Form PCT/IB/304 (July 1998)

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS



Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE Δn MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES WUESTHOFF & WUESTHOFF INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS z.H. Jobst Wibbelmann ODER DER ERKLÄRUNG Schweigerstrasse 2 WUESTHOFF&WUESTH D-81541 München PATENT-UND RECHTSANWAL **GERMANY** (Regel 44.1 PCT) 10 MAL199 9 Absendedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/05/1999 Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts EP-81 607PCT WEITERES VORGEHEN siehe Punkte 1 und 4 unten Internationales Aktenzeichen Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) PCT/EP 98/08001 09/12/1998 Anmelder VON SCHAEWEN, Antje Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird. 1. X Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19: Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46): Bis wann sind Änderungen einzureichen? Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen. Wo sind Änderungen einzureichen? Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20, Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35 Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a) übermittelt wird. Hinsichtlich des Widerspruchs gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsämter dem Internationalen Büro übermittelt worden noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde. 4. Weiteres Vorgehen: Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht: Kurz nach Ablauf von 18 Monaten seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 big bzw. 90 s.3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen. Innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) Innerhalb von 20 Monaten seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsämtern vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Bevollmächtigter Bediensteter

Sandra De Jong-van Dam



NL-2280 HV Rijswijk

Fax: (+31-70) 340-3016

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni,

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO zu entrehmen

Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der Internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bls wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

in welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Ansprüch gestrichen, so brauchen, die anderen Ansprüche nicht neu numeriert zu werden. Im Fall einer Neunumerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der dieinternationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Beglettschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

Anmerkungen zu Formblatt PCT/ISA/220 (Blatt 1) (Januar 1994)

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

- [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:
 "Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
- [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:
 "Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
- 3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]: Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt. "Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
- 4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]: "Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Ansprüch 14 ersetzt; Ansprüch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigefügt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationalen Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den inter nationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf Internationalevorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragen Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung derinternationalen Anmeidung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmter/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordemisse jedes bestimmten/ausgewählten Amts sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	zeichen des Anmelders oder Anwalts WEITERES siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit				
EP-81 607PCT	VORGEHEN zutreffend, nachsteh				
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)			
PCT/EP 98/08001	(Tag/Monat/Jahr) 09/12/1998	09/12/1997			
Anmelder	07/12/17/0	03/12/1337			
Aimedei					
VON SCHAEWEN, Antje					
VON SCHAEWEN, AITCJE					
Dieser internationale Recherchenbericht wurd Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Int	le von der Internationalen Recherchenbehörde ternationalen Büro übermittelt.	e erstellt und wird dem Anmelder gemals			
Dieser internationale Recherchenbericht umfa	aßt insgesamt <u>3</u> Blätter.				
X Darüber hinaus liegt ihm jev	veils eine Kopie der in diesem Bericht genannt	en Unterlagen zum Stand der Technik bei.			
1 Country to Barbaha					
Grundlage des Berichts Grundlage des Berichts Grundlage des Berichts Grundlage des Berichts	rnationale Recherche auf der Grundlage der ir	nternationalen Anmeldung in der Sprache			
durchgeführt worden, in der sie eing	pereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nich	its anderes angegeben ist.			
Die internationale Recherch Anmeldung (Regel 23.1 b))	e ist auf der Grundlage einer bei der Behörde	eingereichten Übersetzung der internationalen			
	an Anmeldung offenbarten Nucleotid- und/od e	er Aminosäureseguenz ist die internationale			
Recherche auf der Grundlage des S	Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das				
	Idung in Schriflicher Form enthalten ist.				
	onalen Anmeldung in computerlesbarer Form	eingereicht worden ist.			
1	th in schriftlicher Form eingereicht worden ist.				
	ch in computerlesbarer Form eingereicht worde hträglich eingereichte schriftliche Sequenzprof				
internationalen Anmeldung	im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorge	elegt.			
Die Erklärung, daß die in co wurde vorgelegt.	omputerlesbarer Form erfaßten Informationen	dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen,			
2. Bestimmte Ansprüche ha	ben sich als nicht recherchierbar erwiesen	(siehe Feld I).			
3. Mangelnde Einheitlichkei	t der Erfindung (siehe Feld II).				
4. Hinsichtlich der Bezelchnung der Erfli	_				
X wird der vom Anmelder ein	gereichte Wortlaut genehmigt.				
wurde der Wortlaut von de	r Behörde wie folgt festgesetzt:				
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung					
	gereichte Wortlaut genehmigt.				
wurde der Wortlaut nach F	legel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fas de innerhalb eines Monats nach dem Datum de Stellungnahme vorlegen.	ssung von der Behörde festgesetzt. Der er Absendung dieses internationalen			
6. Folgende Abbildung der Zeichnunge n	ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlich	en: Abb. Nr			
wie vom Anmelder vorgesc		keine der Abb.			
weil der Anmelder selbst k	eine Abbildung vorgeschlagen hat.				
weil diese Abbildung die E	rfindung besser kennzeichnet.				

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 98/08001

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12N15/82 C12N9/10 C07K16/40 C12N1/00 A01H5/00 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK **B. RECHERCHIERTE GEBIETE** Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12N C07K IPK 6 AO1H Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Kategorie® Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr. WO 92 09694 A (HSC RES DEV LP) X 6.8 - 15.11. Juni 1992 22-28 siehe das ganze Dokument GOMEZ L AND CHRISPEELS M J: Α "Complementation of an Arabidopsis thaliana mutant that lacks complex asparagine-linked glycans with the human cDNA encoding N-acetylglucosaminyltransferase I" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, Bd. 91, Januar 1994, Seiten 1829-1833, XP002100921 siehe das ganze Dokument -/--Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu Siehe Anhang Patentfamilie "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist Absendedatum des internationalen Recherchenberichts Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 22. April 1999 07/05/1999 Bevollmächtigter Bediensteter Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016 Oderwald, H

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/08001

		CT/EP 98/	08001	
	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommend	en Teile	Betr. Anspruch Nr.	
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforgerlich unter Angabe der im Schlechnung			
A	SCHAEWEN VON A ET AL: "ISOLATION OF A MUTANT ARABIDOPSIS PLANT THAT LACKS N-ACETYL GLUCOSAMINYL TRANSFERASE I AND IS UNABLE TO SYNTHESIZE GOLGI- MODIFIED COMPLEX N-LINKED GLYCANS" PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 102, Nr. 4, August 1993, Seiten 1109-1118, XP000645269 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument			

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/FP 98/08001

Im Recherchenberich angeführtes Patentdokun WO 9209694		Datum der Veröffentlichung	Mit Pa	glied(er) der stentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9209694	Λ					
	Α	11-06-1992	AU	8941191	A	25-06-1992

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU PCT WIBBELMANN, Jobst Wuesthoff & Wuesthoff NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE Schweigerstrasse 2 COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL D-81541 München **APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES ALLEMAGNE** (PCT Rule 47.1(c), first sentence) 2 WU 10FF PATENT-UND RECHTS INWAUTE Date of mailing (day/month/year) 25 JUN-18-99 17 June 1999 (17.06.99) Applicant's or agent's file reference IMPORTANT NOTICE EP-81 607PCT Priority date (day/month/year) International filing date (day/month/year), International application No. 09 December 1997 (09.12.97) PCT/EP98/08001 ✓ 09 December 1998 (09.12.98) Applicant VON SCHAEWEN, Antje

 Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU, EP, JP, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

CA

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 17 June 1999 (17.06.99) under No. WO 99/29879

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Authorized officer

J. Zahra

Telephone No. (41-22) 338.83.38

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Continuation of Form PCT/IB/308

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

ate of mailing (day/month/year)	IMPORTANT NOTICE			
17 June 1999 (17.06.99)	1812			
opplicant's or agent's file reference EP-81 607PCT	International application No. PCT/EP98/08001			
EP-01 00/PC1	FC1/EF30/00001			
The applicant is hereby notified that, at the time of lendments under Article 19 has not yet expired and claration that the applicant does not wish to make a	establishment of this Notice, the time limit under Rule 46.1 for making the International Bureau had received neither such amendments nor a amendments.			
	•			

Ser Antrag ist bei der zuständigen mit der intern	ationalen vorläufigen	Prüfung beauftragten Behörde o	der, wenn zwei oder	mehr Behörden zu	ıständig sind, b	ei der
vom Anmelder gewählten Behörde einzureichen.	Der Anmelder kann de	en Namen oder den Zweibuchstab	en-Code der Behörd	le auf der nachsteh	enden Zeile ang	zeben.

IPEA/____

PCT

KAPITEL II

ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

nach Artikel 31 des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens:
Der (die) Unterzeichnete(n) beantragt (beantragen), daß für die nachstehend bezeichnete internationale Anmeldung die internationale vorläufige Prüfung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens durchgeführt wird und benennt hiermit als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten (soweit nichts anderes angegeben).

Von der mit der	internationalen vorläufige	0 0				
Bezeichnung der IPEA		Eingangsdatum des ANTRAGS				
Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DI	ER INTERNATIONALE	N ANMELDUNG	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts EP-81607/PCT			
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmelde (09.12.98)	(Frühester) Prioritätstag (Tag/Monat/Jahr) (09.12.97)			
PCT/EP98/08001	9. Dezember		9. Dezember 1997			
Bezeichnung der Erfindung Pflanz zur Gewinnung von P N-Acetylglucosaminy	tianzen mit ve	Illimiter cer	Verwendung derselben oder fehlender ivität			
Feld Nr. II ANMELDER						
Name und Anschrift: (Familienname, Vor Bezeichnung, Bei de anzugeben.)	name: bei juristischen Person er Anschrift sind die Postleitzahl	en vollständige amtliche und der Name des Staats	Telefonnr.:			
von SCHAEWEN, Antje Natruper Straße 169	a		Telefaxnr.:			
49076 Osnabrück DE		,	Fernschreibnr.:			
49076 Osnabrück DE Staatsangehörigkeit (Staat): DE	e: bei juristischen Personen vollständi;	Sitz oder Wohnsitz DE	(Staat):			
49076 Osnabrück DE Staatsangehörigkeit (Staat): DE	e; bei juristischen Personen vollständig	DE	(Staat):			
49076 Osnabrück DE Staatsangehörigkeit (Staat): DE	e; bei juristischen Personen vollständig	DE	(Staat): r Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugebo			
49076 Osnabrück DE Staatsangehörigkeit (Staat): DE Name und Anschrift: (Familienname, Vornam		DE ge amtliche Bezeichnung. Bei der	(Staat): r Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeb			
49076 Osnabrück DE Staatsangehörigkeit (Staat): DE Name und Anschrift: (Familienname, Vornam		DE ge amtliche Bezeichnung. Bei der	(Staat): r Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeb z (Staat):			
49076 Osnabrück DE Staatsangehörigkeit (Staat): DE Name und Anschrift: (Familienname, Vornam		DE ge amtliche Bezeichnung. Bei der	(Staat): r Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeb			

Blatt Nr. . 2

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/08001

Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTE	LLANSCHRIFT				
Die folgende Person ist X Anwalt gemeinsamer Vertreter					
und x ist vom (von den) Anmelder(n) bereits früher bestellt worden und vertritt i Prüfung.	hn (sie) auch für die internationale vorläufige				
wird hiermit bestellt; eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gem	einsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.				
wird hiermit zusätzlich zu dem bereits früher bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter, nur für das Verfahren vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.					
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname: bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)	Telefonnr.:				
WIBBELMANN, Jobst	089/ 62 18 00-0				
WUESTHOFF & WUESTHOFF	Telefaxnr.:				
Schweigerstraße 2 81541 München	089/ 62 18 00-15				
DE DE	Fernschreibnr.:				
Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt od dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben wird.	er gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt				
Feld Nr. IV GRUNDLAGE DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜ	FUNG				
E-lil					
Erklärung betreffend Änderungen:* 1. Der Anmelder wünscht, daß die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage					
der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung					
der Beschreibung in der ursprünglich eingereichten Fassung					
unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 34					
der Patentansprüche in der ursprünglich eingereichten Fassung					
unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 19 (ggf. zusammen mit Begleitschreiben)					
unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 34					
der Zeichnungen in der ursprünglich eingereichten Fassung					
unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 3- aufgenommen wird.					
2. Der Anmelder wünscht, daß jegliche nach Artikel 19 eingereichte Änderung o	er Ansprüche als überholt angesehen wird.				
Der Anmelder wünscht, daß der Beginn der internationalen vorläufigen Prüf Prioritätsdatum aufgeschoben wird, sofern die mit der internationalen vorläu Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 Absatz d). (Dieses Kästchen darf Artikel 19 noch nicht abgelaufen ist.)	figen Prüfung beauftragte Behörde nicht eine des Anmelders erhält, daß er keine solchen				
* Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen P Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen; wenn eine Kopie d und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen B Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.	er Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 mit der internationalen vorläufigen Prüfung				
Sprache für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung:Deutsch	;				
dies ist die Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wurde.					
dies ist die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen F	echerche eingereicht wurde.				
dies ist die Sprache der Veröffentlichung der internationalen Anmeldung.					
dies ist die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen v	orläufigen Prüfung eingereicht wurde/wird.				
Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATEN					
Der Anmelder benennt hiermit als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten (das durch Kapitel II gebunden sind) mit Ausnahme der folgenden Staaten, die der Anmelder nicht benennen möchte:	heißt, alle Staaten, die bestimmt wurden und				

			_		
В	latt	Nr.	.3	_	

nternatio	nales	Akte	nzei	iche	n
PCT	/EP	98/	08	00	1

Feld Nr. VI KONTROLLISTE							
Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwe Prüfung in der in Feld Nr. IV angegebenen Sprach	Von der mit der interna Prüfung beauftragten E						
1. Übersetzung der internationalen Anmeldung	:	Blätter	erhalten	nicht erhalten			
2. Änderungen nach Artikel 34	:	Blätter					
 Kopie (oder, falls erforderlich, Übersetzung) der Änderungen nach Artikel 19 	:	Blätter					
4. Kopie (oder, falls erforderlich, Übersetzung) einer Erklärung nach Artikel 19	:	Blätter					
5. Begleitschreiben	:	Blätter					
6. Sonstige (einzeln aufführen)	:	Blätter					
Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angel	kreuzten Unterlagen be	i:					
1. x Blatt für die Gebührenberechnung	4.	Begründur	ng für das Fehlen einer U	nterschrift			
2. unterzeichnete gesonderte Vollmacht	5.		und/oder Aminosäuresed in computerlesbarer Form				
3. Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):	6.	•	einzeln aufführen):				
Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELD	ERS, ANWALTS OF	ER GEMEI	NSAMEN VERTRETE	RS			
Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Pers	der Unterschrift zu wie	derholen, un	nd es ist anzugeben, sofer	n sich dies nicht aus			
München, den 6. Juli 1999	on unierzeichnei.						
Dr. Jobst Wibbelmann European Patent Attorney							
The state of the s				·			
Von der mit der internationa	·	g beauftragte	n Behörde auzufüllen 👤	1			
Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS:							
Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1 Absatz b:							
3. Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum; Punkt 4 und Punkt 5, unten, finden keine Anwendung. Der Anmelder wurde entsprechend unterrichtet							
4. Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 80.5.							
5. Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Montaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach Regel 82 ENTSCHULDIGT.							
Vom	Internationalen Büro a	ıuszufüllen					
Antrag vom IPEA erhalten am:							

PATENT COOPERATION TREATY

PCT		From the INTERN	IATIONAL BUREAU			
Einge- gangen	ELECTION WILLE	WALSchweigerstra D _{r.8} 1541 Münc	Vuesthoff sse 2			
Date of mailing (day/month/year) 07 September 1999 (07.09.99)	Of the	<u></u>				
Applicant's or agent's file reference EP-81 607PCT	4	IMPOF	RTANT INFORMATION			
International application No. PCT/EP98/08001	_	late (day/month/year) er 1998 (09.12.98)	Priority date (day/month/year) 09 December 1997 (09.12.97)			
Applicant VON SCHAEWEN, Antje						
1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election: EP:AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE National:AU,CA,JP,US						
The following Offices have waived the solution by the International Bureau only upon to None	requirement for the n heir request:	otification of their electi	on; the notification will be sent to them			
3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).						
Some offices have fixed time limits expapplicable time limits and the acts to be of the PCT Applicant's Guide.	oiring later than the al e performed upon ent	bove-mentioned time lin try into the national pha	nit. For detailed information about the se before a particular Office, see Volume II			
The entry into the European regional pl the European p	nase is postponed un patent.	til 31 months from the p	riority date for all States designated for			
			•			

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Authorized officer:

Jean-Marie McAdams



Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Telephone No. (41-22) 338.83.38

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender:

MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An: WIBBELMANN, Jobst WUSETHOFF & WUESTHOFE MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG WUESTHOFF&WUESTHO Schweigerstrasse 2 DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PATENT-UNE RECHISANWALLE D-81541 München **PRÜFUNGSBERICHTS** ALLEMAGNE 16, FEB. 2000 (Regel 71.1 PCT) Absendedatum 1 4. 02.00 (Tag/Monat/Jahr) Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts WICHTIGE MITTEILUNG EP-81 607PCT Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) Internationales Aktenzeichen 09/12/1997 09/12/1998 PCT/EP98/08001 Anmelder

- Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
- 2. Eine Kopie des Berichts wird gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
- 3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amts wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

17.

VON SCHAEWEN, Antie

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde

Europäisches Patentamt D-80298 München

Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d

Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Vullo, C

Tel. +49 89 2399-8061



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

P-81 607P0	s Anmelders oder Anwalts	WEITERES VORGEHEN	vorläufigen	ung über die Übersendung des internationalen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
010071	T			Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag)
ternationales A	Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum(Tag	/Monat/Jahr)	09/12/1997
CT/EP98/0		09/12/1998		03/12/133/
ternationale P 12N15/82	atentklassification (IPK) ode	r nationale Klassifikation und IPK		
nmelder				
ON SCHA	EWEN, Antje			
. Dieser in Behörde	ternationale vorläufige P erstellt und wird dem An	rüfungsbericht wurde von der mit melder gemäß Artikel 36 übermit	der internati elt.	onale vorläufigen Prüfung beauftragte
		mt 6 Blätter einschließlich dieses		
⊠ Auß und Beh	erdem liegen dem Berich /oder Zeichnungen, die g örde vorgenommenen B	nt ANLAGEN bei; dabei handelt e reändert wurden und diesem Beri erichtigungen (siehe Regel 70.16	s sich um Bl cht zugrunde und Abschr	lätter mit Beschreibungen, Ansprüchen e liegen, und/oder Blätter mit vor dieser nitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT
Diese A	nlagen umfassen insges	amt 5 Blatter.		
3. Dieser	Bericht enthält Angaben :	zu folgenden Punkten:		
	Bericht enthält Angaben :			
I	☐ Grundlage des Beri	chts		thisks Apwordbarkeit
i 11	☐ Grundlage des Beri	chts	nderische T	ätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
 	☐ Grundlage des Berin☐ Priorität☐ Keine Erstellung ein☐	chts nes Gutachtens über Neuheit, erf		ätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
i 11	☑ Grundlage des Berin☐ Priorität☐ Keine Erstellung ein☐ Mangelnde Einheit!	chts nes Gutachtens über Neuheit, erf ichkeit der Erfindung	ah dar Nauh	eit, der erfinderische Tätigkeit und der
 V V	 ☑ Grundlage des Berin ☐ Priorität ☐ Keine Erstellung ein ☐ Mangelnde Einheit! ☒ Begründete Festste gewerbliche Anwer 	chts nes Gutachtens über Neuheit, erf ichkeit der Erfindung ellung nach Artikel 35(2) hinsichtli idbarkeit; Unterlagen und Erkläru	ah dar Nauh	eit, der erfinderische Tätigkeit und der
 V V	 ☑ Grundlage des Berin ☐ Priorität ☐ Keine Erstellung ein ☐ Mangelnde Einheit! ☒ Begründete Festste gewerbliche Anwer ☐ Bestimmte angefüh 	chts nes Gutachtens über Neuheit, erf ichkeit der Erfindung ellung nach Artikel 35(2) hinsichtli idbarkeit; Unterlagen und Erkläru inte Unterlagen	ah dar Nauh	eit, der erfinderische Tätigkeit und der
 V V	 ☑ Grundlage des Berin ☐ Priorität ☐ Keine Erstellung ein ☐ Mangelnde Einheit! ☒ Begründete Festste gewerbliche Anwer ☐ Bestimmte angefüh ☐ Bestimmte Mängel 	chts nes Gutachtens über Neuheit, erf ichkeit der Erfindung ellung nach Artikel 35(2) hinsichtli idbarkeit; Unterlagen und Erkläru inte Unterlagen der internationalen Anmeldung	ch der Neuh ngen zur Sti	eit, der erfinderische Tätigkeit und der
 	 ☑ Grundlage des Berin ☐ Priorität ☐ Keine Erstellung ein ☐ Mangelnde Einheit! ☒ Begründete Festste gewerbliche Anwer ☐ Bestimmte angefüh ☐ Bestimmte Mängel 	chts nes Gutachtens über Neuheit, erf ichkeit der Erfindung ellung nach Artikel 35(2) hinsichtli idbarkeit; Unterlagen und Erkläru inte Unterlagen	ch der Neuh ngen zur Sti	eit, der erfinderische Tätigkeit und der
 	 ☑ Grundlage des Berin ☐ Priorität ☐ Keine Erstellung ein ☐ Mangelnde Einheit! ☒ Begründete Festste gewerbliche Anwer ☐ Bestimmte angefüh ☐ Bestimmte Mängel 	chts nes Gutachtens über Neuheit, erf ichkeit der Erfindung ellung nach Artikel 35(2) hinsichtli idbarkeit; Unterlagen und Erkläru inte Unterlagen der internationalen Anmeldung eungen zur internationalen Anmel	ch der Neuh ngen zur Sti dung	eit, der erfinderische Tätigkeit und der ützung dieser Feststellung
 V 	 ☑ Grundlage des Berin ☐ Priorität ☐ Keine Erstellung ein ☐ Mangelnde Einheit! ☒ Begründete Festste gewerbliche Anwer ☐ Bestimmte angefüh ☐ Bestimmte Mängel 	chts nes Gutachtens über Neuheit, erf ichkeit der Erfindung ellung nach Artikel 35(2) hinsichtli idbarkeit; Unterlagen und Erkläru inte Unterlagen der internationalen Anmeldung eungen zur internationalen Anmel	ch der Neuh ngen zur Sti dung	eit, der erfinderische Tätigkeit und der ützung dieser Feststellung stellung dieses Berichts
 V 	 ☑ Grundlage des Berin ☐ Priorität ☐ Keine Erstellung ein ☐ Mangelnde Einheitl ☑ Begründete Festste gewerbliche Anwen ☐ Bestimmte angefüh ☐ Bestimmte Mängel ☑ Bestimmte Bemerk 	chts nes Gutachtens über Neuheit, erf ichkeit der Erfindung ellung nach Artikel 35(2) hinsichtli idbarkeit; Unterlagen und Erkläru inte Unterlagen der internationalen Anmeldung eungen zur internationalen Anmel	ch der Neuh ngen zur Sti dung	eit, der erfinderische Tätigkeit und der ützung dieser Feststellung stellung dieses Berichts
 V 	 ☑ Grundlage des Berin ☐ Priorität ☐ Keine Erstellung ein ☐ Mangelnde Einheit! ☒ Begründete Festste gewerbliche Anwer ☐ Bestimmte angefüh ☐ Bestimmte Mängel ☒ Bestimmte Bemerk 	chts nes Gutachtens über Neuheit, erf ichkeit der Erfindung ellung nach Artikel 35(2) hinsichtli idbarkeit; Unterlagen und Erkläru inte Unterlagen der internationalen Anmeldung eungen zur internationalen Anmel	ch der Neuh ngen zur Sti dung	eit, der erfinderische Tätigkeit und der ützung dieser Feststellung
	 ☑ Grundlage des Berin ☐ Priorität ☐ Keine Erstellung ein ☐ Mangelnde Einheit! ☒ Begründete Festste gewerbliche Anwer ☐ Bestimmte angefüh ☐ Bestimmte Mängel ☒ Bestimmte Bemerk 	nes Gutachtens über Neuheit, erf ichkeit der Erfindung ellung nach Artikel 35(2) hinsichtli idbarkeit; Unterlagen und Erkläru inte Unterlagen der internationalen Anmeldung eungen zur internationalen Anmel	ch der Neuh ngen zur Sti dung	eit, der erfinderische Tätigkeit und der ützung dieser Feststellung stellung dieses Berichts

Burkhardt, P

Tel. Nr. +49 89 2399 7456

Europäisches Patentamt

Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d

D-80298 München

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER **PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/08001

۱.	Grundlage	des	Berichts
----	-----------	-----	-----------------

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach

۱.	Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlags (Erstaben Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.):						
	Beschreibung, Seiten:						
	1-41	ursprüngliche Fassung					
Patentansprüche, Nr.:							
	1-24	eingegangen am	19/01/2000	mit Schreiben vom	19/01/2000		
Zeichnungen, Blätter:							
	1/6-6/6	ursprüngliche Fassung					
2	2. Aufgrund der Änder	ungen sind folgende Unterlage	en fortgefallen:				
	☐ Beschreibung,	Seiten:					
	Ansprüche,	Nr.:					
	Zeichnungen,	Blatt:					
,	3. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus de angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):						
	4. Etwaige zusätzliche	e Bemerkungen:					
	D -: b-1-44	•					

siehe Beiblatt

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)

Ansprüche Ja:

1 - 17, 21 - 24

Nein: Ansprüche

18 - 20

Erfinderische Tätigkeit (ET)

Ansprüche Ja:

1 - 17, 20 - 24

Nein: Ansprüche 21

Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)

Ansprüche Ja:

1 - 24

Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Zu Punkt l

Grundlage des Berichts

Die mit dem Brief vom 19.01.2000 eingereichten Änderungen genügen den Erfordernissen des Artikels 34(2)(b) PCT.

Zu Punkt V

..)

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen. Ihre Numerierung der im internationalen Recherchenbericht angegebenen Reihenfolge:

- D1 WO-A-9209694 (HSC Research)
- D2 Gomez and Chrispeels, 1994. Plant Biol. 91:1829-1833.

1. Artikel 33(2) (3) PCT (Neuheit und erfinderische Tätigkeit)

- 2.1 Der vorliegende Anspruch 1 bezieht sich auf ein Verfahren zur Erzeugung von Glykoproteinen mit "minimalen, einheitlichen und definierten" Zuckerresten in transgenen Pflanzen. Die Pflanzen werden dabei mit sense- oder antisense-cDNA einer pflanzlichen N-Acetylglucosaminyltransferase I transformiert, um die Aktivität des besagten Enzyms zu verringern oder zu beseitigen.
- 2.2 Das beanspruchte Verfahren wurde im Stand der Technik so wie er der IPEA momentan zu Verfügung steht, weder offenbart noch nahegelegt. Anspruch 1 erscheint deshalb neu und erfinderisch im Sinne des Artikels 33(2) (3) PCT. Dies gilt auch für die abhängigen Ansprüche 2 4.
- 2.3 Die Ansprüche 5, 6 und 7 beziehen sich auf die DNA einer N-Acetylglucosaminyltransferase I (*Gnt*I) aus *Solanum*, *Nicotiana* beziehungsweise *Arabidopsis*. Die betreffenden DNA Sequenzen (SEQ ID NOs 1, 3 und 5) wurden

im Stand der Technik wie er der IPEA zur Verfügung steht weder offenbart noch wurde ihre Isolierung nahegelegt. Die Ansprüche 5, 6 und 7 genügen den Erfordernissen des Artikels 33(2) (3) PCT. Dies gilt auch für die abhängigen Ansprüche 8 - 10 sowie für die Ansprüche 11 - 17 und 22 - 24. Besagte Ansprüche beziehen sich auf DNA-Konstrukte mit den beanspruchten *Gnt*l Sequenzen, transgene Pflanzen und Mikroorganismen, die diese Sequenzen enthalten sowie auf die entsprechenden Proteine (SEQ ID NOs 2, 4 und 6).

- 2.4 Der vorliegende Anspruch 18 bezieht sich auf eine N-Acetylglucosaminyltransferase I, zugänglich über Hybridisierung ihrer komplette DNA Sequenz oder von Teilsequenzen mit den Ansprüchen 5 -10 offenbarten Sequenzen (SEQ ID NOs 1, 3 und 5).
- 2.5 Dokument D1 (Seiten 9-13) offenbart DNA Sequenzen, die für eine tierische und eine humane N-Acetylglucosaminyltransferase I codieren und die mit den oben genannten Sequenzen zwischen 56% und 56,7% identisch sind. Bestimmte Teile der DNA aus D1 sind sogar zu 100% identisch mit den oben genannten Sequenzen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die in D1 offenbarten Sequenzen zumindest in einem oder mehreren Abschnitten mit den in den Ansprüchen 5 10 offenbarten Sequenzen (SEQ ID NOs 1, 3 und 5) hybridisieren. Anspruch 18 genügt deshalb nicht den Erfordernissen des Artikels 33(2) PCT.

Dies gilt auch für den abhängigen Anspruch 19 sowie für den Anspruch 20, da sich die in D1 offenbarten N-Acetylglucosaminyltransferasen durch Substitution, Deletion, Insertion und/oder Modifikation einzelner Aminosäuren und/oder kleiner Gruppen von Aminosäuren, von den N-Acetylglucosaminyltransferasen der Anmeldung ableiten lassen.

2.6 Der vorliegende Anspruch 21 genügt nicht den Erfordernissen des Artikels 33(3) PCT. Der Gegenstand des Anspruches umfasst Antikörper von bekannten Proteinen (siehe 2.5). Die Erzeugung von Antikörpern bekannter Proteine ist für einen Fachmann offensichtlich und umfasst keine erfinderische Tätigkeit.

Zu Punkt VIII

(P)

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Die in Anspruch 1 verwendeten Ausdrücke "... Glykoproteine mit minimalen, einheitlichen und definierten Zuckerresten, ..." erscheinen unklar im Sinne des Artikels 6 PCT. Im Zusammenhang mit den erwähnten Glykoproteinen wird nicht ersichtlich was minimale oder definierte Zuckerreste sind. Es handelt sich bei diesen Begriffen nicht um technische Eigenschaften, die den Gegenstand des Anspruchs 1 eindeutig definieren könnten.

)

Patentansprüche

- Verfahren zur Erzeugung von Glykoproteinen mit minimalen, einheitlichen GlcNAc2Man5-Resten, umfassend das Züchten einer transgenen Pflanze, von Teilen transgener Pflanzen oder von transformierten Pflanzenzellen und das Isolieren des gesuchten Glykoproteins aus dem gezüchteten Material dadurch gekennzeichnet, daß die transgene Pflanze, die Teile transgener Pflanzen bzw. die transformierten Pflanzenzellen mit einem "antisense"-Konstrukt oder einem "sense"-Konstrukt, umfassend eine "antisense"-DNA bzw. "sense"-DNA bezüglich der DNA-Sequenz eines Gens oder einer cDNA für pflanzliche N-Acetylglucosaminyltransferase I oder eines Teils davon, zur Beseitigung oder Verringerung der N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität in diesen transformiert ist bzw. sind, wobei das "antisense" - oder "sense" - Konstrukt gegebenenfalls zusätzlich regulatorische Sequenzen für die Transkription der entsprechenden "antisense"- oder "sense"-DNA enthält.
- 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für die Transformation ein "antisense" oder "sense" Konstrukt bezüglich einer der cDNAs, die N-Acetylglucosaminyltransferase I aus Solanum tuberosum, Nicotiana tabacum oder Arabidopsis thalliana kodieren, verwendet wird.
- 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß für die Transformation ein "antisense" oder "sense" Konstrukt bezüglich einer der in den SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 angegebenen DNA-Sequenzen verwendet wird.
- 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die eingesetzte transgene Pflanze zusätzlich mit dem das gesuchte Glykoprotein kodierenden Gen transformiert worden ist.

- 5. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Solanum tuberosum* kodiert und die in SEQ ID NO: 1 angegebene Nukleotidsequenz umfaßt.
- 6. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Nicotiana tabacum* kodiert und die in SEQ ID NO: 3 angegebene Nukleotidsequenz umfaßt.
- 7. DNA, die N-Acetylglucosaminyltransferase I aus Arabidopsis thaliana kodiert, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA die in SEQ ID NO: 6 angegebene Aminosäuresequenz kodiert oder die in SEQ ID NO: 5 angegebene Nukleotidsequenz umfaßt.
- 8. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie die komplementäre Nukleotidsequenz zu der DNA nach Anspruch 5, 6 oder 7 aufweist.
- 9. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Substitution, Deletion und/oder Insertion einzelner oder mehrerer Nukleotide und/oder Verkürzung am 5'- und/oder 3'-Ende einer der DNAs nach einem der Ansprüche 5 bis 8 erhalten werden kann mit der Maßgabe, daß die DNA unter stringenten Bedingungen mit der Ausgangs-DNA oder deren komplementärer Sequenz hybridisiert.
- 10. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Gen darstellt oder Teil eines Gens ist, das das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I kodiert, und
- mit einer der DNA-Sequenzen nach einem der Ansprüche 5
 bis 9 und/oder
- mit einer DNA-Sequenz, die von den in den SEQ ID NO: 1, 3 und/oder 5 angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes abgeleitet worden ist,

unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

11. DNA-Konstrukt,

dadurch gekennzeichnet, daß es eine oder mehrere der DNAs gemäß einem der Ansprüche 5 bis 10 umfaßt.

- 12. DNA-Konstrukt nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es eine "antisense"- oder "sense"- DNA bezüglich der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 5 bis 10 und ggf. regulatorische Sequenzen für die Transkription der "antisense"- bzw. "sense"-DNA umfaßt.
- 13. Vektor, Plasmid, Cosmid, Viren- oder Phagengenom, dadurch gekennzeichnet, daß er oder es zumindest eine DNA und/oder ein Konstrukt nach einem der Ansprüche 5 bis 12 umfaßt.
- 14. N-Acetylglucosaminyltransferase I aus Arabidopsis thaliana, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die in SEQ ID NO: 6 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt.
- 15. N-Acetylglucosaminyltransferase I, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die in SEQ ID NO: 2 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt.
- 16. N-Acetylglucosaminyltransferase I, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die Aminosäuren 74 bis 446 der in SEQ ID NO: 2 angegebenen Aminosäuresequenz umfaßt.
- 17. N-Acetylglucosaminyltransferase I, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die in SEQ ID NO: 4 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt.
- 18. N-Acetylglucosaminyltransferase I, zugänglich aufgrund der Hybridisierung ihres Gen oder eines oder mehrerer Abschnitte ihres Gens mit einer oder mehreren der DNAs gemäß einem der Ansprüche 5 bis 10.
- 19. Von den Enzymen gemäß einem der Ansprüche 14 bis 18 durch Substitution, Deletion, Insertion und/oder Modifikation einzelner Aminosäuren und/oder kleinerer Gruppen von Aminosäuren



und/oder durch N- und/oder C-terminale Verkürzung und/oder Verlängerung abgeleitete Enzyme oder Proteine.

- 20. Antigen, dadurch gekennzeichnet, daß es
- die in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO: 6 angegebene Aminosäuresequenz oder
- die Aminosäuren 74 bis 446 der in Fig. 2 angegebenen Aminosäuresequenz oder
- eine durch Substitution, Deletion, Insertion und/oder Modifikation einzelner Aminosäuren und/oder kleinerer Gruppen von Aminosäuren von den in SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 angegebenen Aminosäuresequenzen abgeleitete Aminosäuresequenz

umfaßt mit der Maßgabe, daß das Antigen bei Immunisierung eines Wirtes mit diesem zur Bildung einer immunologischen Reaktion einschließlich der Erzeugung von gegen das Antigen gerichteten Antikörpern führt.

21. Monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er spezifisch eines oder mehrere der Enzyme oder Antigene nach einem der Ansprüche 14 bis 20 erkennt und dieses oder diese bindet.

22. Mikroorganismus,

dadurch gekennzeichnet, daß er durch mindestens eine der Nukleotidsequenzen, ausgewählt aus den DNAs, Konstrukten, Vektoren, Plasmiden, Cosmiden, Viren- oder Phagengenomen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 5 bis 13 transformiert ist.

23. Transgene Pflanze, transgener Samen, transgenes Vermehrungsmaterial, Teile transgener Pflanzen oder transformierte Pflanzenzelle, erhältlich durch Integration einer oder mehrerer DNA-Sequenz(en) oder Konstrukt(e) nach einem der Ansprüche 5 bis 11 unter Kontrolle eines in Pflanzen wirksamen Promotors in das Genom einer Pflanze oder durch Infektion durch ein eine oder mehrere DNA-Sequenz(en) oder Konstrukt(e) nach einem der Ansprüche 5 bis 11 enthaltendes Virus für eine extrachromosoma-

le Propagation und Expression der DNA-Sequenz(en) oder des Konstrukts/der Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe.

24. Transgene Pflanze, transgener Samen, transgenes Vermehrungsmaterial, Teile transgener Pflanzen oder transformierte Pflanzenzelle mit fehlender oder verminderter N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität, erhältlich durch Integration eines oder mehrerer "antisense" – oder "sense"-Konstrukt(e) nach Anspruch 12 unter Kontrolle eines in Pflanzen wirksamen Promotors in das Genom einer Pflanze oder durch virale Infektion durch ein ein oder mehrere "antisense" – bzw. "sense"-Konstrukt(e) nach Anspruch 12 enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Transkription von dem oder den "antisense"-Konstrukt(en) oder von dem oder den "sense" – Konstrukt(en) in infiziertem Pflanzengewebe.